

---

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**NAIL-MS Untersuchungen von RNA-Modifikationen  
in eukaryotischen Modellorganismen**

Matthias Fabian Heiß

aus

München, Deutschland

2021



---

### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. Stefanie Kellner betreut.

### Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 13.07.2021 .....

.....  
Matthias Fabian Heiß

Dissertation eingereicht am:

19.05.2021 .....

1. Gutachterin:

Prof. Dr. Stefanie Kellner

2. Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Carell

Mündliche Prüfung am

09.07.2021 .....





*„Success is 1 % inspiration, 98 % perspiration,  
and 2 % attention to detail.“*

---

Philip Humphrey Dunphy



# Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefanie Kellner bedanken. Seit dem Beginn meiner Masterarbeit, in dem damals noch brandneuen Arbeitskreis, wurde ich aktiv in Entscheidungen der alltäglichen Laborarbeit und -gestaltung miteinbezogen. Mir ist bewusst, dass dieses Privileg nur wenigen während einer Masterarbeit oder der Promotion zuteilwird. Für diese intensive Betreuung im Laboralltag bin ich ebenso dankbar, wie für die zahlreichen Tipps, die nicht nur meine wissenschaftliche Kompetenz, sondern auch die Entwicklung meiner Persönlichkeit gefördert haben. Deine große Wertschätzung der Zusammenarbeit im Laboralltag, als auch der Miteinbezug in wichtige Entscheidungen, die Besuche großer wissenschaftlicher Konferenzen und die regelmäßige Evaluation des Prozesses meiner Arbeit stärkten die gemeinsamen Bestrebungen und Ziele. Besonders hervorzuheben ist auch dein Engagement für den sozialen Zusammenhalt innerhalb der Gruppe, welcher stets durch gemeinsame Aktivitäten gestärkt wurde. Für eine ausgewogene Work-Life-Balance wusstest du in deinem Arbeitskreis schon immer bestens zu sorgen. Ich bin davon überzeugt, dass auch in Zukunft noch viele neue MitarbeiterInnen von all diesen positiven Aspekten im AK Kellner profitieren dürfen. Für die lehrreichen Jahre, den respektvollen Umgang miteinander und für die andauernde Unterstützung in meiner wissenschaftlichen und persönlichen Entwicklung bin ich dir sehr dankbar. Ich wünsche dir weiterhin alles Gute und viel Erfolg in deiner steilen Laufbahn.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Thomas Carell für die Anfertigung des Zweitgutachtens danken. Einen besonderen Dank möchte ich auch für die Integration unseres einstmals kleinen Arbeitskreises in den AK Carell aussprechen. Sowohl auf Arbeitsebene als auch auf persönlicher wurden wir herzlich aufgenommen. Dies reicht von der Benutzung diverser Geräte – ohne die ein normaler Ablauf in unserem Labor anfangs nicht möglich gewesen wäre – über wissenschaftliche Ratschläge und Diskussionen, bis hin zur Integration im sozialen Bereich, seien es Weihnachtsfeiern, die alljährliche Grillfeier im Hause Carell oder andere Festlichkeiten.

Bei allen meinen Kollegen und Kolleginnen möchte ich mich für die vielen heiteren Stunden bedanken, die wir miteinander genießen durften. Der gemeinsame Umgang im Labor war stets respektvoll und für das Vertrauen, welches wir untereinander pflegten, bin ich besonders dankbar. Durch den ständigen Austausch im wissenschaftlichen und privaten Umfeld konnten wir

viel voneinander lernen und miteinander wachsen. Es herrschte stets eine inspirierende Dynamik, welche durch viele schöne gemeinsame Erlebnisse geprägt wurde. Eine bessere Arbeitsgruppe kann man sich für seine Promotion wohl kaum vorstellen. Gregor Ammann möchte ich zusätzlich für das sehr hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Ein besonderer Dank geht an meinen langjährigen Kollegen Dr. Valentin Reichle, mit dem sich über die Jahre hinweg über das Kollegenverhältnis hinaus eine tiefe und hoffentlich anhaltende Freundschaft gebildet hat.

Ein großer Dank geht auch an meine Ehefrau Laura Heiß. Du hast immer an mich geglaubt, mich stets bestärkt und mich in meinen Defiziten ergänzt. In schlechten Zeiten weißt du mir durch deine humorvolle Art stets ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern, sei es durch deine abstrakten Tanzeinlagen, deine ausgefallenen Sprüche oder durch sonstige Scherze. Viele wundervolle Jahre durften wir bereits miteinander verbringen und ich freue mich auf viele weitere.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken. Ohne euch wäre mein kompletter Lebensweg wohl anders verlaufen. Bei meinem Vater Alexander Heiß und meiner Mutter Marianne Heiß möchte ich mich sowohl für die finanzielle Unterstützung – an der es mir nie gemangelt hat – als auch die mentale Unterstützung, auf die ich mich stets verlassen konnte, bedanken. Nur durch euch war es mir möglich, mein Studium nun mit dem Ende der Promotion erfolgreich zum Abschluss zu bringen. Aber auch bei meinem Bruder Ferdinand Heiß und bei meiner Oma Elisabeth Stahl möchte ich mich hier noch herzlich für die Bereicherungen, für die ihr in meinem Leben gesorgt habt, bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Publikationsliste .....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	XI
Abstract .....	XIV
<b>1. Einleitung und Theorie .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ribonukleinsäuren und ihre Aufgabe in der Zelle .....	1
1.1.1 Vom genetischen Code zum Protein.....	1
1.1.2 Chemische Modifikationen in RNA .....	3
1.1.3 Die Besonderheiten von tRNA-Molekülen.....	5
1.1.4 Die Prozessierung von tRNA-Molekülen.....	7
1.2 RNA-Modifikationen in Eukaryoten.....	11
1.2.1 Rolle ausgewählter Modifikationen .....	11
1.2.2 Queuosin – ein hypermodifiziertes Nukleosid .....	17
1.2.3 Biologische Funktionen von Queuosin-Derivaten.....	20
1.3 Dynamik des Modifikationsprofils .....	24
1.3.1 Writer, Eraser und Reader.....	24
1.3.2 Verschiedene Stressfaktoren.....	27
1.3.3 Korrelationen zu humanen Krankheiten.....	28
1.4 Detektionsverfahren für RNA-Modifikationen.....	30
1.4.1 Arten von Detektionsmethoden .....	30
1.4.2 Massenspektrometrie zur Untersuchung von RNA- Modifikationen.....	31
1.4.3 Isotopenmarkierung als Hilfsmittel in der Wissenschaft .....	34
<b>2. Ziel der Arbeit.....</b>	<b>37</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>39</b>
3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen .....	39
3.1.1 Uniformität der Isotopenmarkierung .....	93
3.1.2 Einfluss von NAIL-MS auf tRNA-Isoakzeptoren (Northern- Blotting) .....	99

3.1.3	Einfluss von NAIL-MS auf tRNA-Isoakzeptoren (NAIL-MS).....	103
3.1.4	Kinetik des Auf- und Abbaus von RNA-Molekülen.....	108
3.1.5	Prozessierung der 28S rRNA Untereinheit.....	111
3.2	NMR-Untersuchungen zur tRNA Prozessierung in Hefe .....	115
3.3	Funktionen von 5-Methylcytidin in mRNA und tRNA.....	131
3.4	Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle .....	187
3.4.1	Auswirkungen von Queuin-Supplementierung in Zellkultur.....	195
3.4.2	Effekt von Queuosin auf andere Modifikationen .....	200
3.4.3	Vergleichende NAIL-MS Untersuchungen der Queuin-Fütterung	204
3.4.4	Fütterung/Entzug von Queuin in unmarkierter Zellkultur .....	208
3.4.5	Modifikationsdynamik von tRNA in Abhängigkeit von Queuin....	211
3.5	Weitere Nicht publizierte Daten .....	221
3.5.1	Inhibition von ALKBH3 durch Rhein .....	221
3.5.2	Auswirkung von Methylierungs-Stress auf DNA.....	227
3.5.3	Allgemeine Modifikations-Studien .....	232
<b>4.</b>	<b>Fazit &amp; Ausblick .....</b>	<b>239</b>
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>243</b>
5.1	Materialien.....	243
5.2	Zellkulturmethoden .....	248
5.3	Biochemische Methoden .....	250
5.4	Analytik.....	256
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>i</b>
6.1	Zusätzliche Daten .....	i
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	xiv
6.3	Tabellenverzeichnis.....	xvi
<b>7.</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>xvii</b>

# Publikationsliste

## Publikationen die während meiner Promotionszeit erstellt wurden:

- “Cell culture NAIL-MS allows insight into human tRNA and rRNA modification dynamics *in vivo*”, **M. Heiss**, F. Hagelskamp, V. Marchand, Y. Motorin, S. Kellner; *Nat. Comm.*, **2021**, 12 (1): 389.
- „Quantification of modified nucleosides in the context of NAIL-MS“, **M. Heiss**, K. Borland, Y. Yoluç, S. Kellner; *Methods in Mol. Biol.*, **akzeptiert**, RNA Modifications (18)
- „Sequence- and structure-specific cytosine-5 mRNA methylation by NSUN6“, T. Selmi, S. Hussain, S. Dietmann, **M. Heiß**, K. Borland, S. Flad, J.-M. Carter, *et al.*; *Nucleic Acids Research*, **2021**, 49 (2): 1006–1022.
- „Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues“, P. Thumbs, T. T. Ensfelder, M. Hillmeier, M. Wagner, **M. Heiss**, *et al.*; *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **2020**, 59 (30): 12352.
- „Surpassing limits of static RNA modification analysis with dynamic NAIL-MS“, V. F. Reichle, S. Kaiser, **M. Heiss**, F. Hagelskamp, K. Borland, S. Kellner; *Methods (San Diego, Calif.)*, **2019**, 156: 91–101.
- „Cytosine-5 RNA methylation links protein synthesis to cell metabolism“, N. A. Gkatza, C. Castro, R. F. Harvey, **M. Heiß**, M. C. Popis, S. Blanco, S. Bornelöv, *et al.*; *PLoS Biology*, **2019**, 17 (6): e3000297.
- „Time-resolved NMR monitoring of tRNA maturation“, P. Barraud, A. Gato, **M. Heiss**, M. Catala, S. Kellner, C. Tisné; *Nature communications*, **2019**, 10 (1): 3373.

### Konferenzbeiträge

- „RNA Isotope Labeling in various cell types to investigate modification dynamics by NAIL-MS“, Gordon Research Conference 2019 RNA editing (Barga, Italien, März **2019**) and 10<sup>th</sup> Meeting of the GBM Study Section RNA-Biochemistry (Bonn, Deutschland, Oktober **2018**)
- „Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry: NAIL-MS“, 1<sup>st</sup> Symposium on Nucleic Acid Modifications, IMB (Mainz, Deutschland, September **2017**)

### Weitere Publikationen

- „Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS“, **M. Heiss**, VF. Reichle, S. Kellner; *RNA Biology*, **2017**, 14(9): 1260–1268.
- „Detection of nucleic acid modifications by chemical reagents“, **M. Heiss**, S. Kellner; *RNA Biology*, **2017**, 14(9): 1166-1174.
- „Strategies to avoid artifacts in mass spectrometry-based epitranscriptome analyses“, S. Kaiser, SR. Byrne, G. Ammann, **M. Heiss**, PC. Dedon, B. Cao, Stefanie Kellner, *et al.*; *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **eingereicht**.



## Abkürzungsverzeichnis

(H)ESI	(beheizte) Elektrospray-Ionisation
× g	Mehrfaches der Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
18S rRNA	kleine ribosomale Untereinheit (18 Svedberg)
28S rRNA	Teil der großen ribosomalen Untereinheit (28 Svedberg)
3'/5' UTR	3'/5' untranslatierte Region
5,0/5,8S rRNA	kleine Komponenten der großen ribosomalen Untereinheit (5,0/5,8 Svedberg)
5S rRNA	Teil der großen ribosomalen Untereinheit (5 Svedberg)
Å	Ångström
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
APCI	engl.: atmospheric pressure chemical ionization, Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
B&W	Binden und Waschen
BER/NER	Basen/Nukleotid-Exzisionsreparatur
BH2/BH4	Dihydrobiopterin/Tetrahydrobiopterin
BHT	Butylhydroxytoluol
bzw.	beziehungsweise
CID	engl.: collision-induced dissociation, kollisionsinduzierte Dissoziation
CIP	engl.: Calf Intestinal Phosphatase alkalische Phosphatase
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Cy3	Cyanin(3)-Farbstoff

## Abkürzungsverzeichnis

d	Tage
dia.	dialysiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch für
FBS	engl.: fetal bovine serum, fetales Kälberserum
g	Gramm
Gly	Glycin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
H <sub>2</sub> NTP	Dihydroneopterintriphosphat
HEK-293-Zellen	engl.: human embryonic kidney cells (293) menschliche embryonale Nierenzellen (293)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	engl.: high resolution mass spectrometry hochauflösende Massenspektrometrie
IUPAC	engl.: International Union of Pure and Applied Chemistry Internationale Union für reine und angewandte Chemie
kDa	kilo-Dalton
konz.	konzentriert
kV	Kilovolt
L	Liter
LC-MS/MS	engl.: liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
Leu	Leucin
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

MALDI	Matrix–assistierte Laser–Desorption–Ionisierung
MBN	engl.: mung bean, Mungbohne
mg	Milligramm
miCLIP	engl.: methylation dependent individual nucleotide cross-linking immunoprecipitation Immunpräzipitation durch methylierungs-abhängige individuelle Nukleotid-Vernetzung
min	Minuten
mJ	Milli-Joule
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMS	Methylmethansulfonat
MPG	Methylpurin-N-Glykosylasen
mRNA	engl.: messenger RNA, Boten-RNA
n.d.	nicht dialysiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAIL-MS	engl.: nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry Isotopenmarkierung von Nukleinsäuren gekoppelt mit Massenspektrometrie
NLS	engl.: neutral loss scan, Neutralteilchen-Verlust-Scan
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
ON	Oligonukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	Phenylalaninhydroxylase
Phe	Phenylalanin
pmol	Pikomol
QQQ	Triple-Quadrupol
RNA	engl.: ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	engl.: reactive oxygen species, reaktive Sauerstoff-Spezies

rpm	engl.: revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>saccharomyces cerevisiae</i>
s.o.	siehe oben
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate Natriumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SEC	engl.: size exclusion Chromatographie Größenausschlusschromatographie
Ser	Serin
SILAC	engl.: stable isotope labeling by amino acids in cell culture stabile Isotopenmarkierung durch Aminosäuren in Zellkultur
SILIS	engl.: stable isotope labeled internal standard durch stabile Isotopen markierter interner Standard
SPD	engl.: snake venom phosphodiesterase Phosphodiesterase
SSC	engl.: saline sodium citrate, Salzlösung Natriumcitrat
SSPE	engl.: saline sodium phosphate EDTA Kochsalzlösung Natriumphosphat EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THU	Tetrahydrouridin
tiRNA	von tRNA stammende stressinduzierte Fragmente
TOF	engl.: time of flight, Flugzeit
tRF	von tRNA stammende Fragmente
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TRNT1	tRNA-Nukleotidyltransferase 1
TSEN-Komplex	tRNA-Spleiß-Endonuklease-Komplex
Tyr	Tyrosin
U	Unit, Maßeinheit für Enzymaktivität
V	Volt

**Abkürzungsverzeichnis für Nukleoside / häufig vertretene Modifikationen**

ψ	Pseudouridin
A	Adenosin
ac <sup>4</sup> C	<i>N</i> <sup>4</sup> -Acetylcytidin
acp <sup>3</sup> U	3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine
Am	2'- <i>O</i> -Methyladenosin
C	Cytidin
Cm	2'- <i>O</i> -Methylcytidin
D	Dihydrouridin
G	Guanosin
GalQ	Galactosyl-Queuosin
GluQ	Glutamyl-Queuosin
Gm	2'- <i>O</i> -Methylguanosin
hm <sup>5</sup> C	5-Hydroxymethylcytidin
I	Inosin
i <sup>6</sup> A	<i>N</i> <sup>6</sup> -Isopentenyladenosin
m <sup>1</sup> A	1-Methyladenosin
m <sup>1</sup> G	1-Methylguanosin
m <sup>1</sup> I	1-Methylinosin
m <sup>22</sup> G	<i>N</i> <sup>2</sup> , <i>N</i> <sup>2</sup> -Dimethylguanosin
m <sup>2</sup> G	<i>N</i> <sup>2</sup> -Methylguanosin
m <sup>3</sup> C	3-Methylcytidin
m <sup>3</sup> U	3-Methyluridin
m <sup>5</sup> C	5-Methylcytidin
m <sup>5</sup> U	5-Methyluridin
m <sup>66</sup> A	<i>N</i> <sup>6</sup> , <i>N</i> <sup>6</sup> -Dimethyladenosin
m <sup>6</sup> A	<i>N</i> <sup>6</sup> -Methyladenosin
m <sup>7</sup> G	7-Methylguanosin
ManQ	Mannosyl-Queuosin
mcm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin
mcm <sup>5</sup> U	5-Methoxycarbonylmethyluridin

## Abkürzungsverzeichnis

ncm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	5-Carbamoylmethyl-2-thiouridin
ncm <sup>5</sup> U	5-Carbamoylmethyluridin
oQ	Epoxy-Queuosin
preQ <sub>0</sub>	7-Cyano-7-deazaguanosin
preQ <sub>1</sub>	7-Aminomethyl-7-deazaguanosin
Q q, QBase	Queuosin (Nukleosid/Nukleotid) Queuin (Nukleobase)
s <sup>2</sup> U	2-Thiouridin
t <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -Threonylcarbamoyladenosen
U	Uridin
Um	2'-O-Methyluridin
yW	Wybutosin

## Abkürzungsverzeichnis für Nukleosid-modifizierende Enzyme (Writer/Eraser)

ALKBH	Homolog der Fe(II)/α-Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen
bTGT eTGT	bakterielle tRNA-Guanin-Transglykosylase eukaryotische tRNA-Guanin-Transglykosylase
DNMT2	DNA-Methyltransferase 2
FOL-E	Enzym der Queuosin-Biosynthese
QUE- A/C/D/E/F/G	Enzyme der Queuosin-Biosynthese
NSUN2/6	NOP2/Sun RNA-Methyltransferase 2/6
PUS	Pseudouridin-Synthasen
TRMT1	tRNA-Methyltransferase 1
ELP3	Elongations-Komplex-Protein 3
METTL3/6/13	Methyltransferase-like 3/6/13
DKC1	Dyskerin-Pseudouridin-Synthase 1
WDR4	WD-Repeat-Domäne 4
FTO	engl.: Fat mass and obesity-associated protein
TET	Ten-eleven translocation Methylcytosin Dioxygenasen

## Zusammenfassung

In vielen Bereichen der Wissenschaft gewinnt die Dynamik der RNA-Modifikationen zunehmend an Bedeutung. So häufen sich die Nachweise von Korrelationen zwischen bestimmten RNA-Modifikationen und Krankheitsbildern wie Krebs oder neurologischen Störungen. Mutationen im Enzym TRMT1 und eine damit einhergehende Änderung der  $m^{22}\text{G}$ -Abundanz wurde beispielsweise mit der neurologischen Erkrankung amyotrophe Lateralsklerose (ALS) in Verbindung gebracht. Ein besseres allgemeines Verständnis der RNA-Modifikationsdynamik ist daher essenziell. Gerade die molekularen Ursachen und Funktionen der Biosynthese sowie der Reifung und des Abbaus von RNA-Molekülen erfordern eingehendere Untersuchungen.

Massenspektrometrische Analysen tragen dabei maßgeblich zur Untersuchung der molekularen Ursachen und Auswirkungen von RNA-Modifikationen bei. Eine Einschränkung dabei ist allerdings, dass größtenteils statische Level analysiert werden und der Aspekt der Modifikationsdynamik somit meist vernachlässigt wird. Eine Technik, welche imstande ist, einige der Schwächen von Massenspektrometrie zu kompensieren, ist NAIL-MS (Nucleic Acid Isotope Labeling coupled Mass Spectrometry). Am erfolgversprechendsten ist die mögliche Durchführung von „Pulse-Chase“-Experimenten zur simultanen Analyse bereits existierender und neu transkribierter RNA-Moleküle. Das primäre Ziel im Zuge meiner Arbeit bestand daher in der Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen. Die gewünschte Isotopenmarkierung wurde über die Supplementierung von isotopenmarkierten Varianten der Nukleobase Adenin und des Nukleosids Uridin erreicht. Zudem wurde zur Verfolgung von Modifizierungsprozessen dem Zellkulturmedium  $\text{D}_3$ -Methionin zugegeben, welches als Methylgruppen-Donor dient.

Durch die anschließende Anwendung von NAIL-MS war es mir beispielsweise möglich aufzuzeigen, dass das Molekül Rhein vermutlich nicht – wie kürzlich in der Literatur beschrieben – eine spezifische Inhibition des Enzyms ALKBH3 hervorruft. ALKBH3 soll für die Demethylierung von  $m^1\text{A}$  und  $m^3\text{C}$  in tRNA-Molekülen verantwortlich sein. Weder über unmarkierte LC-MS/MS-Analytik noch über NAIL-MS-Untersuchungen konnte ich diese Behauptung jedoch bestätigen. Stattdessen konnte über NAIL-MS ein Effekt von Rhein auf die Transkriptionsrate von tRNA-Molekülen festgestellt werden, wodurch die beobachtete Änderung des Modifikationsprofils hervorgerufen werden. Aufgrund dieser Anpassung entstand vermutlich die Fehlinterpretation, Rhein sei für die spezifische Inhibition von ALKBH3 geeignet. Die in der Literatur beobachteten Effekte können aufgrund der über NAIL-MS erhobenen Daten demnach aber vielmehr auf allgemeine Adaptionsmechanismen der Zellen zurückgeführt werden.

Ebenso gelang es mir, den Effekt des methylierenden Agens Methylmethansulfonat (MMS) auf DNA und RNA näher zu beleuchten. Während MMS in der Wissenschaft oft als Methylierungsagens von DNA-Molekülen verwendet wird, ist eine Methylierung von RNA kaum beschrieben. Über unmarkierte LC-MS/MS-Analytik konnte auch ich ausschließlich Schäden in DNA, aber nicht in RNA detektieren. Durch die Anwendung von NAIL-MS konnte ich jedoch zeigen, dass in RNA MMS-induzierte Methylierungen vergleichbaren Ausmaßes stattfinden. Besonders ausgeprägt ist dies für  $m^7G$  in rRNA; entsprechende Schäden in tRNA werden von der Zelle nahezu vollständig ignoriert. Eine Detektion dieser gelang durch unmarkierte LC-MS/MS-Analytik nicht, da die Menge an Modifikationen in RNA allgemein sehr hoch ist, und somit die vergleichsweise geringen Signale der induzierten Schäden überlagert wurden.

Die mitunter wohl größte Stärke von NAIL-MS ist die Möglichkeit „Pulse-Chase“-Experimente durchzuführen, um einen genaueren Einblick in die RNA-Modifikationsdynamiken zu gewinnen. NAIL-MS ermöglichte mir somit eine genauere Untersuchung des Reifungsprozesses verschiedener RNA-Moleküle. Gängige LC-MS/MS-Analytik kann dadurch um eine Dimension, nämlich Zeit, erweitert werden. So konnte ich zeigen, dass beim Einbau von Modifikationen in tRNA<sup>Phe</sup> eine sequenzielle Ordnung zu bestehen scheint. Während bestimmte Modifikationen in der D-Schleife und der TΨC-Schleife vergleichsweise schnell inkorporiert werden, können hohe Mengen der in der Anticodon-Schleife lokalisierten Modifikationen erst später nachgewiesen werden. Eine Hierarchie im Einbau von Modifikationen wurde ebenso über zeitaufgelöste NMR-Experimente nachgewiesen. Besonders interessant erscheint außerdem die Dynamik von  $m^5U$  in den meisten tRNA-Isoakzeptoren, speziell aber in tRNA<sup>Asn</sup>. Die Menge an  $m^5U$  ist zu Beginn des Lebenszyklus von tRNA-Molekülen stets höher als erwartet und nimmt erst im Laufe der Reifung ab. Dies deutet auf eine bisher nicht beschriebene aktive Demodifizierung einer  $m^5U$ -Position hin und könnte als Teil der Reifung von tRNA-Molekülen essenziell sein.

Einen besonderen Fokus legte ich auf den molekularen Einfluss der Modifikation Queuosin (Q) und dessen Zucker-Derivate. Der Einbau dieser Modifikationen ist von der, in den zugegebenen Nährstoffen enthaltenen Nukleobase Queuin abhängig. Für eine volle Modifizierung der Q-Modifikationen in den entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren ist eine zusätzliche Supplementierung von Queuin nötig. Über NAIL-MS wurden zahlreiche Effekte dieser Supplementierung auf andere Modifikationen erfasst. Wie bereits zuvor berichtet, wurde eine Abhängigkeit zwischen  $m^5C38$  und ManQ34 in tRNA<sup>Asp</sup> beobachtet. In der hier vorgelegten Arbeit konnte ich



näher auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen eingehen. Aufgrund der erhobenen Daten wird ein vergleichbarer Effekt für  $m^1\Psi39$  in  $tRNA^{Tyr}$  postuliert. Im selben tRNA-Isoakzeptor wurde bei Fehlen von Queuin für die Modifikation  $m^{22}G$  eine erhöhte Einbaueffizienz festgestellt. Besonders stark ausgeprägt ist zudem der 20-fache Anstieg von Gm im Vergleich zur ursprünglichen Menge. In An- bzw. Abwesenheit von Queuin scheint die Reifung von tRNA-Molekülen somit stark verändert zu sein. Alle beobachteten Effekte deuten auf eine Abhängigkeit zwischen den einzelnen Modifikationen hin. RNA-Modifikationen, insbesondere in tRNA-Molekülen, sollten daher nicht isoliert, sondern immer in ihrem Netzwerk betrachtet werden. Besonders bei der Untersuchung der Effekte von RNA-Modifikationen und deren Dynamik hinsichtlich der berichteten Krankheitsmodelle sollte dies beachtet werden.

Zusammenfassend konnte ich durch die Anwendung von NAIL-MS zahlreiche bemerkenswerte Mechanismen der Modifikationsdynamik und Unterschiede im Modifikationsprofil beobachten, welche ohne die Anwendung von NAIL-MS größtenteils nicht analysierbar gewesen wären. Der Erkenntnisgewinn bezüglich der untersuchten Mechanismen könnte hinsichtlich des steigenden Interesses an RNA-Modifikationen und deren weitreichenden Einflüsse in der Zelle für klinische Zwecke von hoher Relevanz sein.

## Abstract

In many areas of science, the dynamics of RNA modifications are becoming increasingly important. There is more and more evidence of correlations between certain RNA modifications and diseases such as cancer or neurological disorders. For example, mutations in the TRMT1 enzyme and an associated change in the amount of m<sup>22</sup>G modification have been linked to the neurological disease amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Therefore, a better general understanding of RNA modification dynamics is essential. Especially the molecular causes and functions of biosynthesis, as well as maturation of RNA molecules, but also of their degradation, require more detailed investigations.

Mass spectrometric analyses contribute significantly to the investigation of the molecular causes and effects of RNA modifications. A limitation is, however, that mostly static levels are analyzed, and the aspect of modification dynamics is thus mostly neglected. One technique that is able to compensate for some of the weaknesses of mass spectrometry is NAIL-MS (Nucleic Acid Isotope Labeling coupled Mass Spectrometry). Most promising is the possible performance of Pulse-Chase experiments for simultaneous analysis of pre-existing and newly transcribed RNA molecules. The primary goal of my work was therefore to establish and apply NAIL-MS in cell cultures. The desired isotopic labeling was achieved by supplementing isotopically labeled variants of adenine (nucleobase) and uridine (nucleoside). To follow modification processes, D<sub>3</sub>-methionine was added to the cell culture medium, which serves as a methyl group donor of the methylated modifications.

Subsequent application of NAIL-MS allowed me to demonstrate that the small molecule Rhein probably does not cause specific inhibition of the enzyme ALKBH3, as recently described in literature. ALKBH3 is thought to be responsible for the demethylation of m<sup>1</sup>A and m<sup>3</sup>C in tRNA molecules. However, neither via unlabeled LC-MS/MS analysis nor via NAIL-MS studies could I confirm this hypothesis. Instead, NAIL-MS revealed an effect of Rhein on the transcription rate of tRNA molecules, causing the observed change in the modification profile. This adaptation probably led to the misinterpretation of Rhein being suitable for the specific inhibition of ALKBH3. However, based on the NAIL-MS data, effects observed in literature can rather be attributed to general adaptation mechanisms of the cells.

I also succeeded in shedding more light on the effect of the methylating agent methyl methanesulfonate (MMS) on DNA and RNA. While MMS is often used in science as a methylating agent of DNA molecules, methylation of RNA has hardly been described. Using unlabeled LC-MS/MS analysis, I also could only detect damage in DNA but not in RNA. By using NAIL-MS, however, I was able to show that damage of comparable dimension occurs in RNA molecules. These could not be detected by unlabeled LC-MS/MS analysis, due to the generally very high levels of modifications in RNA molecules. Especially rRNA seems to be affected, whereas damage in tRNA is almost completely ignored by the cell.

Probably one of the greatest strengths of NAIL-MS is the ability to perform Pulse-Chase experiments to gain a more detailed insight into RNA modification dynamics. NAIL-MS thus allowed me to examine the maturation process of various RNA molecules in more detail. Common LC-MS/MS techniques can thus be extended by the dimension "time". Thus, I could show that there seems to be a sequential order in the incorporation of modifications into tRNA<sup>Phe</sup>. While certain modifications in the D-loop and the TΨC-loop are incorporated comparatively quickly, high amounts of modifications localized in the anticodon loop can only be detected later. A hierarchy in the incorporation of modifications was also demonstrated by time-resolved NMR experiments. Furthermore, the dynamics of m<sup>5</sup>U in most tRNA isoacceptors, but especially in tRNA<sup>Asn</sup>, appears to be particularly interesting. The amount of m<sup>5</sup>U is always higher than expected at the beginning of the life cycle of tRNA molecules and only decreases during maturation. This suggests a previously undescribed active demodification of an m<sup>5</sup>U position and could be essential as part of the maturation of tRNA molecules.

I placed a particular focus on the molecular impact of the queuosine modifications. The incorporation of this modification is dependent on the nutrient queuine. For a full modification of the Q-modifications in the corresponding tRNA isoacceptors, an additional supplementation of queuine is necessary. Numerous effects of this supplementation on other modifications were detected via NAIL-MS. As previously reported, a dependency between m<sup>5</sup>C38 and ManQ34 in tRNA<sup>Asp</sup> was observed. In the work presented here, I was able to elaborate on the underlying molecular mechanisms. Based on the data collected, a comparable effect is postulated for m<sup>1</sup>Ψ39 in tRNA<sup>Tyr</sup>. In the same tRNA isoacceptor, increased incorporation efficiency was observed in the absence of queuine for the m<sup>22</sup>G modification. Moreover, the 20-fold increase in Gm compared with the original amount is particularly striking. In the presence or absence of queuine, the maturation of tRNA molecules thus appears to be strongly altered. All observed

effects indicate a dependence between the individual modifications. RNA modifications, especially in tRNA molecules, should therefore not be considered in isolation but always in their corresponding network. Especially when studying the effects of RNA modifications and their dynamics with respect to reported disease models, this should be kept in mind.

In summary, through the application of NAIL-MS, I was able to observe numerous remarkable mechanisms of modification dynamics and differences in modification profiles, most of which would not have been analyzable without the application of NAIL-MS. The knowledge of the investigated mechanisms could potentially be of high relevance for clinical purposes due to the increasing interest in RNA modifications and their far-reaching influences in the cell.

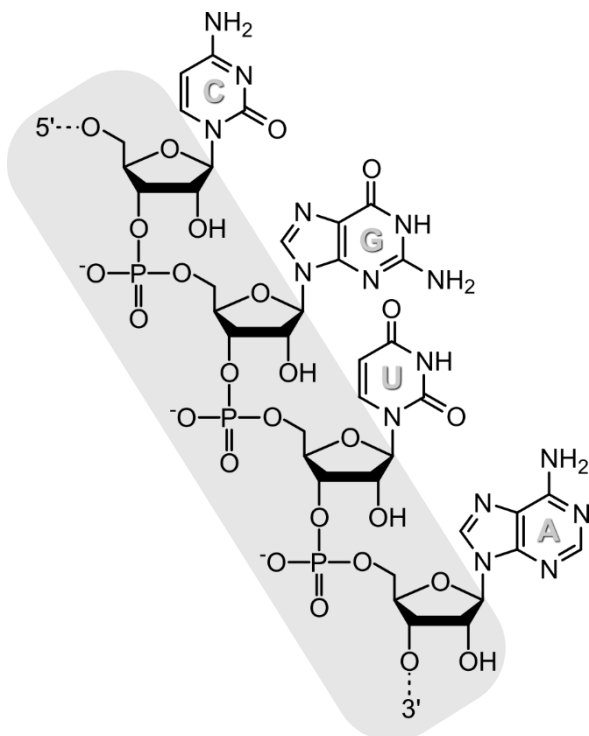
# 1. Einleitung und Theorie

## 1.1 Ribonukleinsäuren und ihre Aufgabe in der Zelle

### 1.1.1 Vom genetischen Code zum Protein

Vielen mag der Name Francis Crick im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bekannt sein. Zusammen mit James Watson gelang ihm im Jahr 1953 die Aufklärung des Aufbaus der DNA als Doppelhelix.<sup>1</sup> Zudem stellte er das sogenannte „zentrale Dogma der Molekularbiologie“ auf, welches noch heute als Grundpfeiler dieser Forschungsrichtung angesehen wird. Seine 1958 erstellte Hypothese – welche er 1970 geringfügig überarbeitete – besagt, dass DNA in Ribonukleinsäure (RNA) transkribiert, also übertragen wird, welche wiederum als Vorlage für die Translation, also Übersetzung in Proteine dient.<sup>2</sup> Während dies zwar nur eine stark vereinfachte Darstellung der entsprechenden zellulären Prozesse liefert, behält die Kernaussage bis heute ihre Gültigkeit. Die zentrale Rolle in diesem System wird demnach von RNA eingenommen.

Das Grundgerüst von RNA-Molekülen ist stets identisch: Der eigentliche Code wird geschaf-



**Abbildung 1.1: Aufbau von RNA.** Das Phosphat-Rückgrat ist grau hinterlegt. Die Nukleobasen von oben nach unten (5' → 3') sind Cytosin (C), Guanin (G), Uracil (U) und Adenin (A).

fen, indem die vier Nukleobasen Cytosin, Uracil, Guanin und Adenin, in bestimmter Abfolge aneinandergereiht werden. In DNA wird Uracil dabei durch das strukturell ähnliche Thymin ersetzt. Diese werden über eine glykosidische Bindung an das C1'-Atom einer Ribose gekoppelt (in DNA wird Desoxyribose verwendet), und bilden somit die Nukleoside Cytidin (C), Uridin (U), Guanosin (G) und Adenosin (A). Durch das Anfügen einer Phosphatgruppe an die Hydroxygruppe des C5'-Atoms der Ribose werden dann die entsprechenden Nukleotide gebildet. Diese werden anschließend über ein Phosphodiester-Ribose-Rückgrat, (kurz: Phosphat-Rückgrat) miteinander verbunden, wodurch ein Strang von aufeinanderfolgenden Nukleobasen entsteht (**Abbildung 1.1**). Die

## 1.1 Ribonukleinsäuren und ihre Aufgabe in der Zelle

einzelnen Nukleotide werden aus kleinen Metaboliten wie CO<sub>2</sub>, Glutamin, Aspartat, Glycin, Formiat und Glukose von einem Biosyntheseapparat der Zellen synthetisiert und dienen anschließend dem Aufbau von RNA-Molekülen (**Abbildung S1**). Je nach sequenzieller Anordnung dieser, entstehen in Form von Boten-RNA (engl. messenger RNA, mRNA),<sup>3, 4</sup> nicht nur die Baupläne unterschiedlichster Proteine, sondern auch viele weitere RNA-Moleküle, welche essenzielle Funktionen im zellulären Umfeld übernehmen. Weitere häufig in der Zelle vertretene RNA-Moleküle sind beispielsweise Transfer-RNAs (tRNA), welche als Adapter-Moleküle zur Bereitstellung der zur Proteinbiosynthese benötigten Aminosäuren dienen, oder auch die ribosomale RNA (rRNA), welche enzymatisch an der eigentlichen Proteinbiosynthese beteiligt ist.<sup>5-7</sup> Darüber hinaus existieren noch unzählige weitere RNA-Moleküle wie beispielsweise „small interfering“ RNA (siRNA), „micro“ RNA (miRNA) oder „small noncoding“ RNA (snRNA), welche größtenteils in die Regulierung der Transkription und Translation involviert sind.

All diese RNA-Moleküle unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihrer Primärstruktur – also der sequenziellen Anordnung der Nukleotide – sondern auch in ihrer räumlichen Struktur, die über Faltung dieser Nukleotid-Ketten durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen zustande kommt. Für die korrekte Faltung in die Sekundärstruktur ist die Ausbildung der Basenpaare C:G und U:A ausschlaggebend (bzw. T:A in DNA). Da dies die ersten in DNA entdeckten strukturegebenden Wechselwirkungen waren, spricht man auch von Watson-Crick-Basenpaaren. Während das Basenpaar C:G dabei drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, sind es im Basenpaar U:A lediglich zwei. Ähnlich wie in der DNA kann es durch die Ausbildung von Basenpaaren auch in RNA zu einer Zusammenlagerung zu doppelsträngigen Elementen kommen. Für die anschließende Faltung in die Tertiärstruktur sind ebenfalls vorrangig Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich, teilweise sind jedoch auch andere Wechselwirkungen wie Dipol-Dipol- und van-der-Waals-Kräfte beteiligt. Ein Beispiel für eine solche Faltung wird später anhand von tRNA-Molekülen noch genauer betrachtet.

Zudem unterscheiden sich die verschiedenen RNA-Moleküle stark in ihrer Länge. So bestehen die 18S und die 28S Untereinheiten der rRNA – welche für den Translationsprozess zusammengeführt werden müssen – aus jeweils ~ 1800 und ~ 5000 Nukleotiden. Für gewöhnlich bestehen mRNA-Moleküle aus mehreren Tausend Nukleotiden, wohingegen tRNA-Moleküle stets eine Länge von 76–93 Nukleotiden aufweisen.<sup>8, 9</sup> Alle übernehmen in einem großen Netzwerk entscheidende Funktionen, um einen geregelten Ablauf in der Zelle zu gewährleisten.

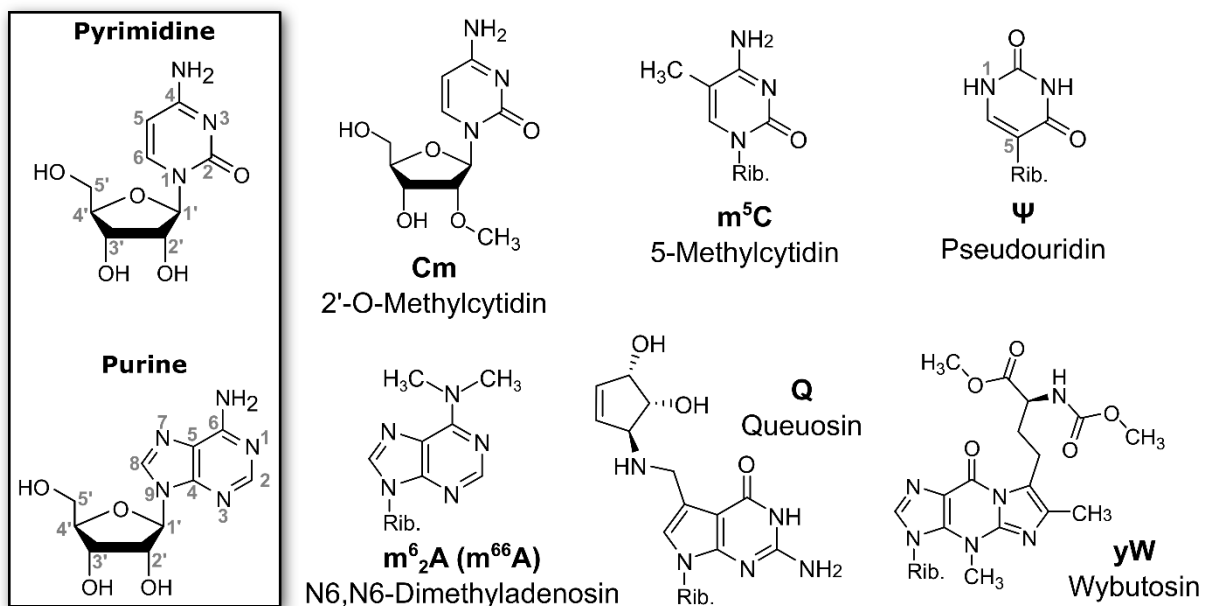
### 1.1.2 Chemische Modifikationen in RNA

Neben den vier kanonischen Nukleosiden C, U, G und A treten in der RNA jedoch auch zahlreiche chemische Abwandlungen, sogenannte RNA-Modifikationen auf. Diese sorgen für eine spezifischere Anpassung der RNA-Moleküle auf ihre jeweilige Aufgabe. Das Forschungsgebiet um RNA-Modifikationen, welches deren Einbau in RNA-Moleküle und die Abhängigkeiten untereinander, sowie die molekularen Auswirkungen behandelt, wird RNA-Epigenetik oder auch Epitranskriptomik genannt. Aktuell sind über 170 strukturell verschiedene RNA-Modifikationen bekannt,<sup>10</sup> welche unterschiedlichste Funktionen in der Zelle übernehmen. Durch die Beeinflussung von Basenpaarungseigenschaften reichen die Effekte von einer Feinabstimmung der Translation, über die Stabilisierung von räumlichen Strukturen bis hin zur modulierten Erkennung durch Enzyme.<sup>11, 12</sup> Ein Großteil der RNA-Modifikationen ist entweder in die Stabilisierung oder anderweitige Modifizierung der Tertiärstruktur oder in die Unterstützung der Codon-Anticodon-Erkennung involviert. Interaktionen zwischen zwei Nukleosiden werden dabei durch verstärkte oder verringerte Basenstapelung und durch ionische Effekte beeinflusst.<sup>13, 14</sup> So kann der Einbau einer Methylgruppe beispielsweise eine Verschlechterung der Basenpaarungseigenschaften des entsprechenden Nukleosid-Paares hervorrufen. Oftmals führen fehlende Modifikationen zu Translationsdefekten wie z.B. Rastermutationen. Auf einige spezielle Mechanismen am Beispiel ausgewählter Modifikationen soll später noch genauer eingegangen werden.

Um eine einheitliche Nomenklatur zu gewährleisten, bekommt jedes einzelne Atom der Nukleoside eine festgelegte Zahl zugewiesen. Die Nummerierung der Pyrimidine (C und U) erfolgt dabei nach der IUPAC-Nomenklatur. Die Zählweise beginnt in der Nukleobase am Stickstoff der glykosidischen Bindung und wird so fortgesetzt, dass die im Ring befindlichen Heteroatome möglichst kleine Zahlen erhalten. Die Nummerierung der Purine beginnt traditionsbedingt am von der glykosidischen Bindung am weitesten entfernten Ringstickstoff und endet am Stickstoff der glykosidischen Bindung (**Abbildung 1.2**). Die Nummerierung der Ribose folgt wiederum der IUPAC-Nomenklatur entsprechend der Fischer-Projektion, wobei jede Position hier zusätzlich ein Apostroph erhält, um eine Differenzierung zwischen den Atomen der Ribose und der Nukleobase zu gewährleisten. Da die Phosphatgruppen der Nukleotide jeweils die 5'-Position der Ribose des einen Nukleosids mit der 3'-Position des vorherigen Nukleosids verbindet, weist jeder RNA-Strang ein 5'-Ende („Anfang“) und ein 3'-Ende („Ende“) auf. Die Hydroxygruppe am 2'-Kohlenstoff der Ribose bleibt frei (siehe **Abbildung 1.1**).

## 1.1 Ribonukleinsäuren und ihre Aufgabe in der Zelle

Für die zusätzlichen funktionalen Gruppen der RNA-Modifikationen werden die Abkürzungen der Gruppe vor das Kürzel des entsprechenden kanonischen Nukleosids gestellt (m für Methyl, s für Schwefel, n für Amino, uvm., komplette Liste in **Tabelle S1**). Eine hochgestellte Ziffer zwischen beiden Buchstaben gibt dabei die Position der Gruppe im Ring an (siehe 5-Methylcytidin: m<sup>5</sup>C). Bei mehreren Gruppen werden diese nacheinander einzeln aufgezählt, wobei bei mehrfachem Auftreten einer Gruppe an derselben Ringposition entweder eine tiefgestellte Ziffer für die Anzahl, oder eine weitere Ausführung der hochgestellten Ziffer eingefügt werden kann (siehe N6,N6-Dimethyladenosin: m<sup>6</sup><sub>2</sub>A oder m<sup>66</sup>A). Befindet sich die funktionale Gruppe an der Ribose wird die entsprechende Abkürzung erst nach dem Kürzel des kanonischen Nukleosids angefügt (siehe 2'-O-Methylcytidin: Cm). Einige Modifikationen weisen große funktionale Gruppen auf oder können aus anderen Gründen nur schwer durch die oben beschriebene Nomenklatur benannt werden. Hier werden teils eigene Buchstaben/Symbole verwendet (siehe Pseudouridin: Ψ, Queuosin: Q, Wybutosin: yW).



**Abbildung 1.2: Nomenklatur und Beispiele von RNA-Modifikationen.** Die Zählweise für die korrekte Nomenklatur von Pyrimidin- (C und U) und Purin-Modifikationen (G und A) wird im Kasten links angegeben. Einige Modifikationen zur Veranschaulichung der korrekten Nomenklatur sind rechts ergänzt. Rib. = Ribose.

Ein Großteil der Modifikationen sind einfache Methylierungen der entsprechenden Nukleobase. So konnten schon früh 2-Methyladenosin (m<sup>2</sup>A), N6-Methyladenosin (m<sup>6</sup>A) und N6,N6-Dimethyladenosin in Hefe und 5-Methylcytidin in *E. coli* nachgewiesen werden.<sup>15, 16</sup> Des Weiteren wurden methylierte Guanosinderivate in Pflanzen, Hefe, Bakterien und Säugetieren identifiziert.<sup>17</sup> Besonders in rRNA sind häufig auch Methylierungen der freien Hydroxygruppe am



2'-Kohlenstoffatom der Ribose vertreten. Weitere chemische Modifizierungen wie Thiolierungen, Desaminierungen, Acetylierungen oder gar die Kopplung zu größeren Molekülen, wie beispielsweise zu Aminosäuren, treten fast ausschließlich in tRNA-Molekülen auf. Bei der Kopplung zu großen funktionalen Gruppen, wie es zum Beispiel auch für Queuosin oder Wybutosin der Fall ist, spricht man allgemein von hypermodifizierten Nukleosiden. Eine besonders häufig vertretene Modifikation ist Pseudouridin ( $\Psi$ ).<sup>18-20</sup> Diese wurde zu Anfang als fünftes Nukleosid beschrieben und bekam daher ein eigenes Symbol zugewiesen.  $\Psi$  wird durch Pseudouridin-Synthasen (PUS) in RNA-Moleküle inkorporiert indem die C-N glykosidische Bindung des Uridins aufgebrochen, die Nukleobase um ihre eigene N3-C6-Achse gedreht, und anschließend über eine C-C glykosidische Bindung wieder mit der Ribose verknüpft wird.<sup>21</sup> Die Nummerierung der Atome ändert sich dadurch nicht und kann **Abbildung 1.2** entnommen werden. Heutzutage ist klar, dass viele RNA-Modifikationen universell in allen Bereichen des Lebens und in einer Vielzahl von verschiedenen RNA-Molekülen vorzufinden sind.

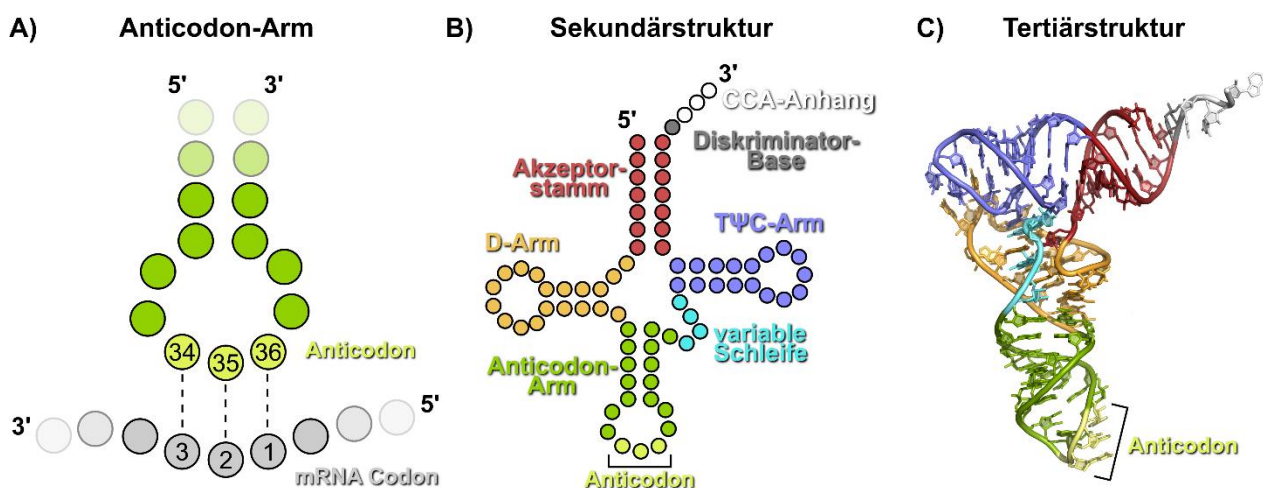
### 1.1.3 Die Besonderheiten von tRNA-Molekülen

Wie bereits zuvor erwähnt, dient die tRNA als Adapter-Molekül für die Bereitstellung der bei der Biosynthese von Proteinen benötigten Aminosäuren. Jedes tRNA-Molekül wird am 3'-Ende der Nukleotid-Sequenz mit einer definierten Aminosäure beladen. Prinzipiell wird die Vermittlung der korrekten Aminosäure dann über die Basenpaarung des Anticodons der tRNA zum revers komplementären Codon der mRNA sichergestellt (**Abbildung 1.3 A**). Die Nukleobasen des Anticodons treten dabei im katalytischen Zentrum des Ribosoms über Wasserstoffbrückenbindungen mit den entsprechenden Basen des Codon-Tripletts der mRNA in Wechselwirkung. Bei einem Repertoire von 20 verschiedenen Aminosäuren wäre demnach theoretisch eine Anzahl von 20 verschiedenen tRNA-Molekülen erforderlich. Durch die Anordnung von vier unterschiedlichen Basen (C, U, G und A) in einem Tripletts entstehen jedoch  $4^3 = 64$  verschiedene Anticodon-Möglichkeiten. Durch diese sogenannte Degeneration des genetischen Codes kann ein und dieselbe Aminosäure somit unter Umständen durch verschiedene tRNA-Moleküle mit abweichenden Anticodon-Tripletts decodiert werden. tRNA-Moleküle, welche die gleiche Aminosäure übertragen, jedoch ein unterschiedliches Anticodon aufweisen werden tRNA-Isoakzeptoren genannt. Für die explizite Angabe der einzelnen tRNA-Isoakzeptoren wird das Kürzel der entsprechenden Aminosäure in dieser Arbeit hochgestellt, gefolgt vom Anticodon in tiefgestellter Schrift. So ergibt sich für den Tyrosin (Tyr) übertragenden tRNA-Isoakzeptor mit dem Anticodon GUA beispielsweise die Abkürzung tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub>.

## 1.1 Ribonukleinsäuren und ihre Aufgabe in der Zelle

Die Existenz von tRNA-Isoakzeptoren führt dazu, dass einige Aminosäuren von mehreren verschiedenen tRNA-Isoakzeptoren decodiert werden können. Die Aminosäure Leucin (Leu) wird beispielsweise durch sechs verschiedene Codone beschrieben und könnte daher von sechs verschiedenen tRNA-Isoakzeptoren mit abweichendem Anticodon decodiert werden. Glycin (Gly) kann von jedem beliebigen tRNA-Isoakzeptor mit dem Anticodon NCC decodiert werden, wobei für N jedes beliebige Nukleotid eingesetzt werden kann. Tatsächlich werden in humanen Zellen allerdings weitaus weniger als 64, nämlich < 45 verschiedene tRNA-Moleküle verwendet.<sup>22</sup> Dies wird möglich, indem ein und derselbe tRNA-Isoakzeptor wiederum unterschiedliche mRNA-Codone ablesen kann. Größtenteils wird das durch die Inkorporation von RNA-Modifikationen an der tRNA-Position 34 im Anticodon, auf welche später noch genauer eingegangen wird, realisiert. Der tRNA-Isoakzeptor  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{GUA}}$  decodiert beispielsweise einerseits das revers komplementäre Codon UAC, ist andererseits durch den Einbau von Galaktosyl-Queuosin (GalQ) anstelle von G aber auch in der Lage das Codon UAU abzulesen, welches ebenso für Tyrosin codiert.<sup>23, 24</sup> Für zwei unterschiedliche Codone, wird demnach nur ein tRNA-Isoakzeptor verwendet. Zusätzlich existieren tRNA-Moleküle, die sich weder in der zu übertragenden Aminosäure noch in der Anticodon-Sequenz unterscheiden. Diese tRNA-Moleküle variieren lediglich in anderen Sequenzbereichen oder den inkorporierten RNA-Modifikationen und werden tRNA-Isodecoder genannt.

Bis auf wenige Ausnahmen weisen alle tRNA-Isoakzeptoren eine kleeblattförmige Sekundärstruktur auf, welche wiederum in verschiedene Bereiche unterteilt werden kann: Am Akzeptorstamm wird eine definierte Aminosäure über einen CCA-Rest durch die entsprechende



**Abbildung 1.3: Struktur von tRNA.** (A) Die Basenpaarungen des tRNA Anticodons (grün) mit dem mRNA Codon (grau). (B) Zweidimensionale „Kleeblatt“-Struktur von tRNA. Die einzelnen Bereiche sind unterschiedlich eingefärbt. (C) Dreidimensionale Faltung von tRNA durch Hybridisierung von D- und TΨC-Schleife. Als Vorlage dient  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  aus *S. cerevisiae* (1EHZ in Protein-Datenbank: PDB).

Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit dem 3'-Ende der tRNA verbunden. Auf den Akzeptorstamm folgt vom 5'-Ende beginnend der D-Arm, der Anticodon-Arm, die variable Schleife und der TΨC-Arm oder auch kurz T-Arm genannt (**Abbildung 1.3 B**). Jeder Arm besteht dabei aus einem doppelsträngigen Stamm, in dem einzelne Basen über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander paaren, und einer einzelsträngigen Wendung, auch Schleife genannt. Der Akzeptorstamm und der D-Arm sind hauptsächlich für die korrekte Erkennung durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beteiligt und gewährleisten somit die Beladung des tRNA-Moleküls mit der passenden Aminosäure. Außerdem dienen die sogenannte Diskriminator-Base, welche sich direkt 5' vor dem CCA-Anhang befindet, und andere Sequenzelemente, die sich typischerweise im Anticodon-Arm befinden, der Erkennung durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen.<sup>25</sup>

Das Anticodon besteht, wie die Codone der mRNA auch, aus drei aufeinanderfolgenden Nukleobasen. Das Anticodon einer jeden tRNA paart revers komplementär mit dem entsprechenden Codon der mRNA und sorgt somit für den Einbau der korrekten Aminosäure in die wachsende Polypeptidkette. Der TΨC-Arm ist hauptsächlich an Interaktionen mit dem Ribosom beteiligt und unterstützt somit eine effiziente Translation. Für die Faltung in die L-förmige Tertiärstruktur hybridisieren Teile der D-Schleife mit der TΨC-Schleife, welche zusammen die „Ellenbogen“-Domäne der tRNA ausbilden (**Abbildung 1.3 C**). Die variable Schleife weist, wie der Name schon vermuten lässt, in unterschiedlichen tRNA-Molekülen eine variable Länge auf. Eine durchgehende Nummerierung der tRNA-Moleküle ist aufgrund der unterschiedlichen Länge der variablen Schleife oftmals nicht möglich. Stattdessen werden einzelne Positionen in der D-Schleife und der variablen Schleife, welche lediglich vereinzelt in tRNA-Molekülen vertreten sind, bei der fortschreitenden Nummerierung übersprungen und stattdessen mit zusätzlichen Buchstaben nummeriert.<sup>26</sup> Das Anticodon befindet sich somit immer an den Positionen 34–36 und auch andere regelmäßig auftretende Modifikationen wie beispielsweise Ψ55 in der TΨC-Schleife, erhalten so stets die gleiche Nummer. Dies erleichtert den Vergleich des Modifikationsprofils zwischen verschiedenen tRNA-Molekülen.

### 1.1.4 Die Prozessierung von tRNA-Molekülen

Alle RNA-Moleküle durchlaufen nach der Transkription eine Prozessierung. Ein Teil dieser ist das Spleißen, also das Herausschneiden bestimmter Sequenz-Elemente. In Eukaryoten wird tRNA im Zellkern von RNA-Polymerase III transkribiert. Der Großteil der entstehenden prä-tRNAs ist mit einem 5'-Anfang (5'-Leader) und einem 3'-Anhänger (3'-Trailer) ausgestattet, welche im Zuge der Reifung von tRNA-Molekülen durch zwei unterschiedliche Endonukleasen

## 1.1 Ribonukleinsäuren und ihre Aufgabe in der Zelle

abgespalten werden. Während der 5'-Leader durch RNase P entfernt wird und ein 5'-Monophosphat hinterlässt, übernimmt RNase Z das Entfernen des 3'-Trailers.<sup>27–30</sup> An das entstehende 3'-Ende wird durch tRNA-Nukleotidyltransferase 1 (TRNT1) anschließend ein CCA-Trinukleotid angefügt.<sup>31</sup> In einigen Fällen befindet sich zusätzlich ein Intron, also ein zu entfernender Sequenz-Abschnitt in der Anticodon-Schleife. Diese Exzision wird im Menschen durch den tRNA-Spleiß-Endonuklease(TSEN)-Komplex eingeleitet, der die initiale Spaltungsreaktion durchführt.<sup>32</sup> Die weiteren Schritte und beteiligten Enzyme konnten jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Alle gespleißten Oligonukleotide wurden in Zellen nachgewiesen und könnten somit ebenfalls in regulatorische Funktionen involviert sein. Ein Überblick der tRNA-Prozessierung ist in **Abbildung 1.4 A** gegeben.

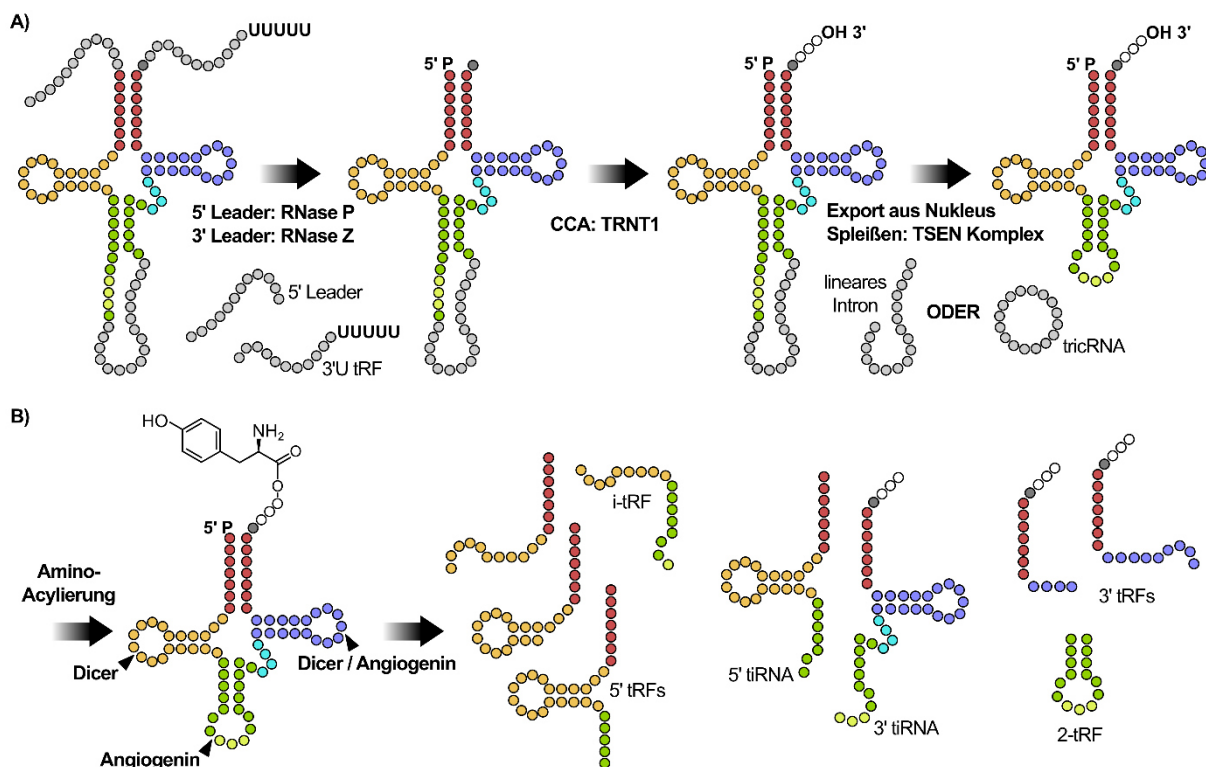
Die Inkorporation von RNA-Modifikationen kann dabei Einfluss auf die tRNA-Reifung nehmen, genauso ist es jedoch möglich, dass der Einbau einer bestimmten Modifikation erst nach Spleißen des tRNA-Moleküls vorgenommen werden kann. Ein Beispiel wäre das notwendige Vorhandensein eines Introns in tRNA<sup>Tyr</sup> für die Modifizierung von U35 zu Ψ35, welches für die korrekte Codon-Erkennung unabdinglich ist. Ein ähnlicher Mechanismus konnte für die Modifizierung von C34 zu m<sup>5</sup>C34 in tRNA<sup>Leu</sup> beobachtet werden.<sup>33–35</sup>

Doch auch nach vollständiger Reifung der tRNA-Moleküle beschränkt sich die Funktion dieser nicht nur auf die Bereitstellung der entsprechenden Aminosäuren für die Proteinbiosynthese. Durch verschiedene enzymatische Prozesse können tRNA-Moleküle in kleinere Fragmente gespalten werden (**Abbildung 1.4 B**). Obwohl die Unterteilung in der Literatur nicht einheitlich ist, können die entstehenden RNA-Moleküle grob zwei Hauptgruppen zugewiesen werden. Zum einen die tRNA-Hälften, welche durch ribonukleolytische Spaltung reifer tRNAs unter Stressbedingungen durch die Endonuklease Angiogenin gebildet werden. Dieses schneidet in der Anticodon-Schleife und es entstehen ein ~ 33 Nukleotide langes 5'-tRNA Fragment und ein etwas längeres 3'-tRNA Fragment.<sup>36–39</sup> Diese werden auch als von tRNA stammende, stressinduzierte kleine RNAs (tiRNAs) bezeichnet.<sup>37</sup> Zum anderen entsteht durch die endonukleolytische Spaltung durch Dicer oder Angiogenin im D- oder TΨC-Arm eine scheinbar eigenständige Gruppe von kleinen RNAs, welche allgemein als von tRNA stammende RNA-Fragmente (tRFs) eingestuft werden.<sup>40–42</sup> Dieser Mechanismus scheint unabhängig von Stressbedingungen aufzutreten und betrifft sowohl reife als auch Vorläufer-tRNA-Moleküle. Die Funktion all dieser kleinen RNA-Moleküle konnte noch nicht vollständig geklärt werden, allerdings wurde vermehrt eine Assoziation von tRFs und tiRNAs mit der Translationsmaschinerie fest-

gestellt.<sup>43, 44</sup> Ein erhöhtes Level an tRNA-Fragmenten konnte durch verringerte Mengen an Polysomen mit allgemein reduzierter Proteinbiosynthese in Verbindung gebracht werden. Interessanterweise scheint dieser Mechanismus durch RNA-Modifikationen regulierbar zu sein. Beim Fehlen von m<sup>5</sup>C38 in tRNA<sup>Asp</sup><sub>GUC</sub> wird dieser tRNA-Isoakzeptor beispielsweise anfälliger gegenüber der Endonuklease Angiogenin. Somit erhöht sich die Anzahl der tiRNAs, welche wiederum eine Herabregulation der allgemeinen Proteinbiosynthese bewirken.<sup>23, 24</sup>

Allgemein ist die Inkorporation von RNA-Modifikationen in tRNA-Moleküle ein wichtiger Teil der Prozessierung. Schon früh konnte gezeigt werden, dass sich der Großteil der Modifikationen im „löslichen“ Teil der RNA befindet, heute ist bekannt, dass dieser Teil hauptsächlich tRNA enthält.<sup>45</sup> Von den derzeit über 170 bekannten RNA-Modifikationen konnten 93 Varianten in tRNA-Molekülen nachgewiesen werden. Dort können sie entsprechend ihrer Komplexität grob in zwei Gruppen unterteilt werden:

In der ersten Gruppe sind größtenteils einfache Methylierungen oder andere einfache Modifikationen, welche durch eine einzelne enzymatische Reaktion inkorporiert werden können, vertreten. Diese können sich an nahezu jeder Position des tRNA-Moleküls befinden, treten jedoch vermehrt im D-Arm und TΨC-Arm auf, wo sie die Stabilisierung der tertiären Struktur über-



**Abbildung 1.4: Prozessierung von tRNA-Molekülen.** (A) Reifung von tRNA-Molekülen am Beispiel von tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub>. (B) Vollständig prozessierte tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub> mit Aminosäure und mögliche ribonukleolytische Spaltungen von tRNA-Molekülen durch Dicer und Angiogenin.



nehmen. So befindet sich an Position 55 beispielsweise durchgängig die Modifikation  $\Psi$  während an Position 54 oftmals ein 5-Methyluridin ( $m^5U$ , teilweise auch rT) vorzufinden ist.<sup>46</sup> Gerade  $\Psi55$  nimmt eine essenzielle Rolle in der Hybridisierung der Schleife des T $\Psi$ C-Arms mit der Schleife des D-Arms ein, indem ein tertiäres Basenpaar zwischen  $\Psi55$  und G18 gebildet wird ( $\Psi55:G18$ ). Somit wird die Stabilität der Ellenbogen-Domäne und folglich die dreidimensionale Struktur der tRNA-Moleküle erhöht.<sup>47</sup> Aufgrund der hohen evolutionären Konservierung der Modifikationen wurde dieser Bereich schließlich T $\Psi$ C-Arm genannt. Aufgrund vermehrten Auftretens der Dihydrouridin-Modifikation (D) erhielt entsprechend der D-Arm seinen Namen.<sup>48</sup> Ähnlich häufig wie  $\Psi$  und universell in allen Domänen des Lebens konserviert ist die Modifikation 1-Methyladenosin ( $m^1A$ ). Die Methylierungen von A an Position 58 und Position 9 in tRNA sind dabei besonders häufig vertreten und verleihen der tRNA-Tertiärstruktur zusätzliche strukturelle Stabilität.<sup>49, 50</sup>

Modifikationen der zweiten Gruppe zeichnen sich durch allgemein höhere Komplexität aus und können größtenteils in, oder nahe der Anticodon-Schleife vorgefunden werden. Sie sorgen einerseits für die korrekte Ausrichtung des Anticodons und ermöglichen durch Modulierung der Codon-Anticodon-Erkennung zusätzlich eine effiziente Translation.<sup>51, 52</sup> Da das korrekte Auslesen des mRNA-Codons lediglich durch das Anticodon und dessen benachbarten Nukleotide beeinflusst wird, ist eine exakte Abstimmung auf die entsprechenden Umstände von höchster Relevanz. Daher ist die strukturelle Variabilität der RNA-Modifikationen im Bereich des Anticodons ausgesprochen hoch. Besonders häufig treten Modifikationen an der Wobble-Position (Position 34) der tRNA auf. Diese bildet ein Basenpaar mit der dritten Base des entsprechenden Codons der mRNA aus, und sorgt bei Anwesenheit einer Modifikation für eine Änderung der Bindungseigenschaften.<sup>12</sup> Während man früher, wie der Name impliziert (engl. wobble = wackelig), von einer prinzipiell lockereren Bindung zum Codon ausgegangen ist, sind heutzutage auch Fälle nachgewiesen, in denen die Wobble-Modifikation einen gegenteiligen Effekt auf die Bindung aufweist und den Codon-Anticodon-Duplex als Ganzes verstärkt, indem die Form der tRNA-Wendung angepasst wird.<sup>53, 54</sup> Somit wird zum einen die Translationsgenauigkeit verbessert, über die Beeinflussung der Translationsgeschwindigkeit kann aber auch die Faltung des Proteins moduliert werden. Einen ähnlichen Einfluss zeigen Modifikationen, welche sich direkt nach dem Anticodon an Position 37 befinden. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel ist die Inkorporation von  $\Psi37$  anstelle von G37 in Hefe tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub>, welche durch verstärkte Basenstapelung und ionische Wechselwirkungen innerhalb des Ribosoms die Codon-Anticodon-Interaktion stabilisiert.<sup>13, 14</sup> Das Fehlen von  $\Psi37$  kann dabei, wie das Fehlen von vielen anderen Modifikationen nahe des Anticodons auch, zu Translationsdefekten führen.

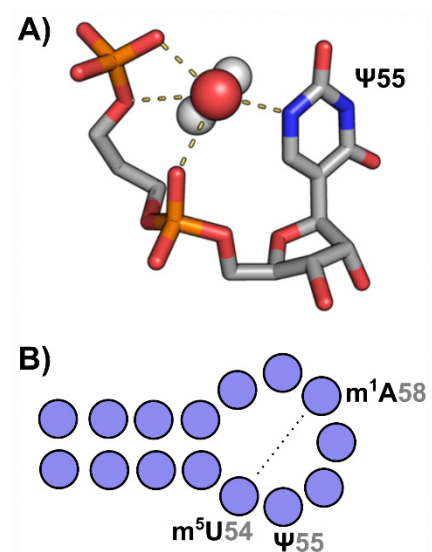
## 1.2 RNA-Modifikationen in Eukaryoten

### 1.2.1 Rolle ausgewählter Modifikationen

Während zuvor schon auf ein paar allgemeine Effekte von RNA-Modifikationen eingegangen wurde, soll in diesem Kapitel ein stärkerer Fokus auf einige ausgewählte Modifikationen gelegt werden. Da in dieser Arbeit größtenteils das Modifikationsprofil von tRNA-Molekülen untersucht wurde, wird der Schwerpunkt dabei auf Modifikationen gelegt, welche vermehrt in tRNA-Molekülen vorzufinden sind. Eine besondere Aufmerksamkeit erhalten Modifikationen nahe des Anticodons und im TΨC-Arm, allerdings wird auch auf einige weitere, hoch konservierte RNA-Modifikationen eingegangen. Dies soll zu einem groben Überblick und dem allgemeinen Verständnis der Wirkmechanismen von Modifikationen in tRNA-Molekülen beitragen. Eine genaue Charakterisierung aller in tRNA-Molekülen vertretenen Modifikationen würde den Umfang dieser Arbeit deutlich überschreiten.

#### Modifikationen im TΨC-Arm

Mitunter die höchste Dichte an Modifikationen herrscht im TΨC-Arm der tRNA-Moleküle. Wie schon zuvor erwähnt ist die namensgebende Modifikation Ψ55 in nahezu allen Organismen, und fast allen tRNA-Isoakzeptoren vorzufinden. Ψ55 trägt durch die Ausbildung eines tertiären Basenpaares mit G18 in der D-Schleife zur Faltung in die korrekte dreidimensionale Struktur von tRNA-Molekülen bei.<sup>55</sup> Interessanterweise sind über die gesamte tRNA-Struktur verteilt weitere Ψ-Modifikationen vertreten, welche möglicherweise ebenfalls zur Stabilisierung der korrekten Form beitragen.<sup>56, 57</sup> Eine chemische Besonderheit von Ψ ist die C-C glykosidische Bindung der Nukleobase zur Ribose. Somit steht für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zusätzlich das N1-Wasserstoffatom der Nukleobase zur Verfügung. Für die Ausbildung von Wechselwirkungen bietet Ψ in der *anti*-Konformation die geeignete Geometrie und Distanz für die Koordination eines Wassermoleküls zwischen ebendiesem N1-H und den Sauerstoff-Atomen der Phosphodiester-Bindungen sowohl von Ψ zum vorherigen



**Abbildung 1.5: Modifikationen im TΨC-Arm.** (A) Struktur von Ψ55 und die Koordination eines Wassermoleküls über benachbarte Sauerstoff-Atome des Phosphat-Rückgrats. Adaptiert von Lorenz *et al.*<sup>12</sup> (B) TΨC-Arm mit häufig auftretenden Modifikationen.

Nukleosid, als auch der vorhergehenden beiden Nukleosiden (**Abbildung 1.5 A**).<sup>58, 59</sup> Zusätzlich zwingt  $\Psi$  die Ribose in eine 3'-*endo*-Konformation und erhöht somit die Stapelungseigenschaften zu benachbarten Nukleobasen. Tatsächlich treten vermehrt Berichte auf, dass die verbesserte Basenstapelung der wichtigste Beitrag von  $\Psi$  zur Stabilisierung der tRNA-Struktur sein könnte.<sup>60–64</sup> Beide Effekte schränken die Basenkonformation und die Beweglichkeit des Phosphat-Rückgrats ein und führen somit zu mehr Starrheit der tertiären Struktur.<sup>60, 61</sup> Nichtsdestotrotz konnte in Zellen mit fehlendem  $\Psi55$  in tRNA-Molekülen kein signifikanter Phänotyp festgestellt werden. Trotz der universellen Inkorporation von  $\Psi55$  in tRNA-Moleküle und dessen Einfluss auf die Struktur, scheint  $\Psi55$  weder für die Aminoacylierung noch für die Translation zwingend erforderlich zu sein.<sup>65</sup>

Abgesehen von  $\Psi55$ , welches mit G18 interagiert, bilden noch weitere Modifikationen in der T $\Psi$ C-Schleife tertiäre Basenpaare aus, welche ebenfalls zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur beitragen. In der Ellenbogenregion des L-förmigen tRNA-Moleküls bilden sich die tertiären Basenpaare G18: $\Psi55$ , G19:C56 sowie m<sup>5</sup>U54:m<sup>1</sup>A58 aus, um die tertiäre Struktur der tRNA zu stabilisieren (**Abbildung 1.5 B**).<sup>47, 55, 66</sup> In den meisten tRNA-Isoakzeptoren sind diese zusätzlich für die korrekte Erkennung durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen relevant.<sup>67, 68</sup> So wurde beispielsweise gezeigt, dass jeder Austausch von G18: $\Psi55$  oder G19:C56, der die Ausbildung von tertiären Strukturen unterbindet, die Übertragung der Aminosäure Leucin auf den entsprechenden tRNA-Isoakzeptor aufhebt.<sup>69</sup> Das tertiäre Basenpaar m<sup>5</sup>U54:m<sup>1</sup>A58 spielt dabei eine besonders wichtige Rolle bei der Aminoacylierung: Durch die Methylierung befindet sich m<sup>1</sup>A58 in einem vollständig protonierten und dadurch positiv geladenen Zustand. Durch eine Nicht-Watson-Crick-Basenpaarung mit m<sup>5</sup>U54 wird die Ladung des Adenins auf der Oberfläche der tRNA präsentiert,<sup>70</sup> welche dort an der spezifischen Erkennung der tRNA durch diverse Proteine beteiligt sein könnte.<sup>70</sup>

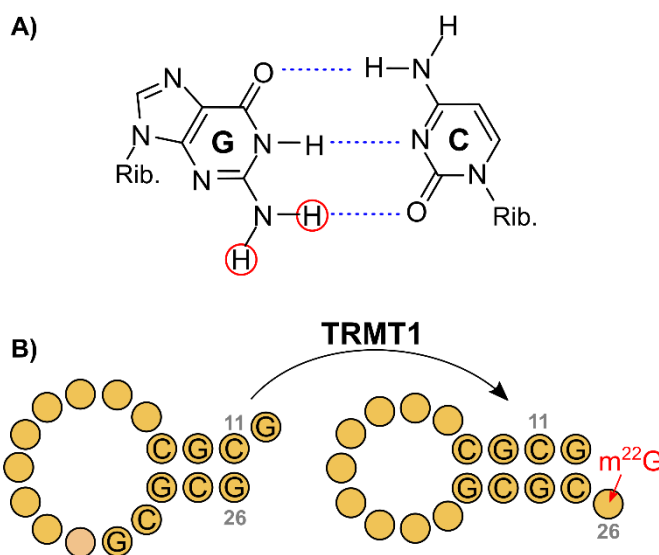
### N2,N2-Dimethylguanosin nahe des D-Arms

Besonders in GC-reichen Sequenzen besteht oftmals die Möglichkeit der Ausbildung alternativer Basenpaare, welche zu inkorrektter Faltung der tRNA-Moleküle führen. Durch die doppelte Methylierung von Guanosin am N2-Atom entsteht N2,N2-Dimethylguanosin (m<sup>22</sup>G). Aufgrund der resultierenden Eliminierung des Wasserstoffbrücken-Donors an dieser Position kann kein Watson-Crick-Basenpaar mehr ausgebildet werden. (**Abbildung 1.6 A**). Dementsprechend werden Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen wie G:U-Wobbles oder G:A-Wechselwirkungen bevorzugt. Lediglich durch modifizierte sterische Anordnung des Cytosins könnte ein alternatives G:C-Basenpaar gebildet werden, indem ein Wassermolekül im vergrößerten Raum



zwischen N3 des Cytosins und N1 des Guanins koordiniert.<sup>71</sup> Der Einbau von  $m^{22}G$  im oder nahe des D-Arms sorgt oftmals für die korrekte Faltung des tRNA-Moleküls.<sup>71, 72</sup> Ein Beispiel wäre der humane zytosolische Isoakzeptor tRNA<sup>Asn</sup>, in dem sich an Position 26 ein  $m^{22}G$  befindet und somit die Bildung der kanonischen C11:G26-Bindung unterbricht, wodurch das Transkript in die korrekte Struktur gezwungen wird (**Abbildung 1.6 B**).<sup>71</sup> Ähnliche strukturelle Effekte sind für tRNA<sup>Tyr</sup> beschrieben worden.<sup>73, 74</sup> Diese Beispiele verdeutlichen, wie die Inkorporation einer einzelnen Modifikation die Faltung der dreidimensionalen Struktur beeinflussen kann.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass nahezu alle  $m^{22}G$ -Modifikationen in mitochondrialer sowie zytoplasmatischer humaner tRNA durch das Enzym tRNA-Methyltransferase 1 (TRMT1) eingebaut werden.<sup>75</sup> Bei Abwesenheit von  $m^{22}G$  in TRMT1-Knockout-Zellen konnte eine verringerte globale Translationsrate und Hypersensitivität gegenüber oxidierenden Agen-



**Abbildung 1.6:  $m^{22}G$  in tRNA.** (A) Basenpaarung zwischen Guanosin und Cytidin. Rot umkreiste Wasserstoffatome stehen bei zweifacher Methylierung ( $m^{22}G$ ) nicht mehr zur Verfügung. (B) Effekt von  $m^{22}G$  auf die Struktur des D-Arms von tRNA<sup>Asn</sup>.

zien detektiert werden.<sup>75</sup> Dies impliziert eine biologische Rolle von  $m^{22}G$  im Redox-Stoffwechsel. Mutationen in TRMT1 führen dabei zu bestimmten Formen von autosomal-rezessiver geistiger Beeinträchtigung. Interessanterweise konnte eine Transfektion der mutierten Variation, welche in Patienten der autosomal-rezessiven geistigen Beeinträchtigung vorgefunden wurde, beobachtete Effekte in TRMT1-Knockout-Zellen nicht umkehren. Dies spricht für die direkte Involvierung von  $m^{22}G$  in die Ausprägung ebendieses Phänotyps.

### 5-Methylcytidin nahe des Anticodons

Die Modifikation 5-Methylcytidin konnte schon früh an den Positionen C34, 38, 40, 48–50 und 72 nachgewiesen werden. Nach bisherigem Wissensstand sind die katalysierenden Enzyme für die Inkorporation in zytoplasmatische tRNA-Moleküle in humanen Zellen NSUN2, NSUN6 und DNMT2. Im Zuge dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass NSUN6 hauptsächlich Methylierungen in der mRNA katalysiert. Dort beeinflusst  $m^5C$  die mRNA-Translation, den

## 1.2 RNA-Modifikationen in Eukaryoten

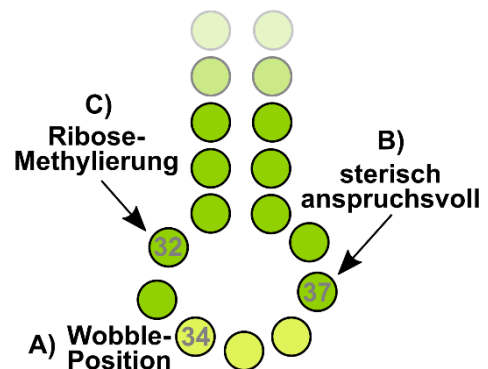
Transport und die Stabilität von mRNA. Die Modifikation ist dabei vorwiegend in der kodierenden Sequenz angereichert, wobei Sequenzabschnitte, welche unmittelbar nach Start-Codonen und vor Stopp-Codonen lokalisiert sind, die höchste Menge an m<sup>5</sup>C aufwiesen.<sup>76</sup> Kürzlich durchgeführte Studien zeigten, dass eine negative Korrelation zwischen m<sup>5</sup>C und der mRNA-Translationseffizienz signifikant mit der Anreicherung von Methylierungen in der codierenden Sequenz verbunden war, während eine erhöhte Methylierung in der 3'-UTR mit einer positiven Korrelation zwischen diesen Merkmalen verbunden war.<sup>76–79</sup>

DNMT2 katalysiert spezifisch die Methylierung an Position 38 einiger tRNA-Moleküle, während NSUN2 für die meisten anderen Positionen zuständig ist.<sup>80, 81</sup> Allgemein führt der Einbau von m<sup>5</sup>C zu mehr Stabilität der tRNA-Struktur und dient der Regulierung des Zellstoffwechsels.<sup>77, 81–84</sup> In Hefe ist der Anteil der TRM4(NSUN2-Homolog)-modifizierten m<sup>5</sup>C-Stellen in tRNA<sup>Leu</sup><sub>CCA</sub> bei oxidativem Stress (dort: Wasserstoffperoxid) beispielsweise erhöht, um die Translation spezifisch auf die Stressantwort anzupassen. Das bedeutet, dass einzelne Modifikationen, wie in diesem Fall m<sup>5</sup>C, für eine Umprogrammierung des Zellmetabolismus notwendig, jedoch gleichzeitig ausreichend sind.<sup>85</sup> Entsprechend wurde in NSUN2-Mutanten eine reduzierte tRNA-Stabilität und eine Hypersensitivität gegenüber oxidativem Stress beobachtet.<sup>82, 86</sup> Des Weiteren beeinflusst m<sup>5</sup>C den Ort der Mg<sup>2+</sup>-Kontakte mit dem Phosphat-Rückgrat. Die Bindung von Mg<sup>2+</sup> ist essenziell für die Stabilität von tRNA-Molekülen, indem die negativen Ladungen des Phosphat-Rückgrats abgeschirmt werden. Die Methylierung in m<sup>5</sup>C40 sorgt somit für eine Delokalisation des Mg<sup>2+</sup>-Ions in den oberen Teil des Anticodon-Stamms.<sup>87, 88</sup>

Die DNMT2-abhängige Methylierung an Position 38 der Isoakzeptoren tRNA<sup>Gly</sup><sub>GGG</sub> und tRNA<sup>Asp</sup><sub>GTC</sub> schützt dagegen vor endonukleolytischer Spaltung durch Angiogenin.<sup>89</sup> Wie schon zuvor besprochen würden die so entstehenden tiRNAs eine Herabregulation der allgemeinen Proteinbiosynthese induzieren. Darüber hinaus wurde berichtet, dass in Doppel-Knockout-Zellen von NSUN2 und DNMT2 eine starke Reduktion der Isoakzeptoren tRNA<sup>Gly</sup><sub>GGG</sub> und tRNA<sup>Asp</sup><sub>GTC</sub> beobachtet werden konnte, während dies in DNMT2<sup>-/-</sup> oder NSUN2<sup>-/-</sup> Single-Knockout-Zellen nicht der Fall war.<sup>90</sup> Dies deutet auf eine kooperative Stabilisierung der entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren durch beide Enzyme hin.

### Weitere Modifikationen in der Anticodon-Schleife

Häufig in der Anticodon-Schleife inkorporierte Modifikationen sind Wobble-Uridine an Position 34 (**Abbildung 1.7 A**). So ist U34 in fast ausnahmslos jedem Organismus modifiziert.<sup>91,92</sup> Bei der gleichzeitig hohen Variation der exakten chemischen Struktur kann von einem starken evolutionären Druck der Modifizierung dieser Position ausgegangen werden. Weitestgehend nehmen unmodifizierte Uridine eine C2'-*endo*-Konformation an, welche relativ flexibel ist und somit nur schwache Stapelwechselwirkungen mit benachbarten Nukleosiden zulässt.<sup>93,94</sup> Das Vorhandensein von 2-Thiomodifikationen in Uridinen führt zur Präferenz der C3'-*endo*-Konformation, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen und optimierter Basenstapelung zur korrekten Ausrichtung der Base in der Anticodon-Schleife sorgt.<sup>94,95</sup> Somit werden Basenpaarungen mit A im mRNA-Codon begünstigt.<sup>93,94</sup> Während eine Thiolierung die Konformation der Anticodon-Schleife also einschränkt, besteht die Rolle weiterer modifizierter Gruppen an C5 der Nukleobase, wie sie beispielsweise in 5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine (mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) vorzufinden sind, der Verschiebung der Elektronverteilung im Ring zugunsten der Enol-Form der Nukleobase. Somit wird die strukturelle Starrheit ein wenig gelockert und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen U34 und G im mRNA Codon werden möglich.<sup>96,97</sup> Die Modifizierung von U34 sorgt somit durch optimale Modellierung der Anticodon-Schleife allgemein für eine effektive Translation.<sup>98</sup> Da die Effekte von inkorporierten Wobble-Uridinen an Position 34, wie eben beschrieben oftmals voneinander abweichen, kann eine allgemeine Aussage zur exakten Funktion und der Effekte auf die Basenpaarungseigenschaften nicht getroffen werden.<sup>99</sup> Einen guten Überblick über die verschiedenen modifizierten Nukleoside an Position U34 liefert Takai und Yokoyama.<sup>100</sup>



**Abbildung 1.7: Positionen häufig modifizierter Nukleoside in der Anticodon-Schleife.**

Abgesehen von Wobble-Uridinen werden auch andere Modifikationen in der Anticodon-Schleife inkorporiert. Ein Beispiel ist tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub> bei dem unter anderem U35 durch Ψ35 ersetzt wird. Durch das entsprechende Anticodon GΨA können die Stopp-Codone UAA und UAG abgelesen werden, was somit zu einer Suppression der Translations-Termination führt.<sup>101</sup> Es wurde postuliert, dass Ψ35 durch verstärkte Basenpaarung mit A im mRNA-Codon nicht-kanonische Interaktionen wie G:A oder G:G an der Wobble-Position verstärkt.<sup>61</sup> Wie dennoch

dafür gesorgt wird, dass die entsprechenden Stopp-Codone nicht unabsichtlich durch tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub> abgelesen werden, wird im **Kapitel 1.2.2 Queuosin – ein hypermodifiziertes Nukleosid** näher behandelt.

Eine zuvor schon angeschnittene Aufgabe der Modifikationen in der Anticodon-Schleife ist die Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur ebendieser. Für die korrekte Decodierung des mRNA-Codons ist eine akkurate Ausrichtung der Basen des tRNA-Anticodons essenziell. Modifikationen an Position 34 und 37 sorgen oftmals für die Ausbildung einer sogenannten U-Wende in der Anticodon-Schleife, welche für die korrekte Ausrichtung der Nukleobasen sorgt. Dies wird durch den erhöhten hydrophoben Charakter der entsprechenden Modifikationen und der daraus resultierenden besseren Stapelbarkeit zu benachbarten Basen bewerkstelligt.<sup>102</sup> Diese Wechselwirkungen reduzieren die strukturelle Flexibilität der Anticodon-Schleife und verstärken somit die Ausprägung der typischen U-Wende, wie sie für ein korrektes Ablesen des Codons essenziell ist.<sup>51</sup> Die kanonische Anticodon-Schleife besteht aus sieben ungepaarten Nukleobasen. Bei der Abwesenheit von bestimmten Modifikationen in dieser Schleife konnten sowohl Wechselwirkungen zwischen U32 und A38 als auch von U33 mit A37 festgestellt werden, was zu einem Zusammenbruch der typischen U-Wende und somit zu verringerter Translationseffizienz und -genauigkeit führte.<sup>103–105</sup> In nativen tRNA-Molekülen wird dies oftmals durch den Einbau sterisch anspruchsvoller Modifikationen an Position 37 verhindert (**Abbildung 1.7 B**).<sup>51, 106, 107</sup> Prominente Beispiele für Modifikationen, welche diese Funktion übernehmen sind Wybutosin, Threonylcarbamoyladenosin (t<sup>6</sup>A) oder auch 2-Methylthio-N<sup>6</sup>-isopentenyladenosin (ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A).<sup>103, 107, 108</sup>

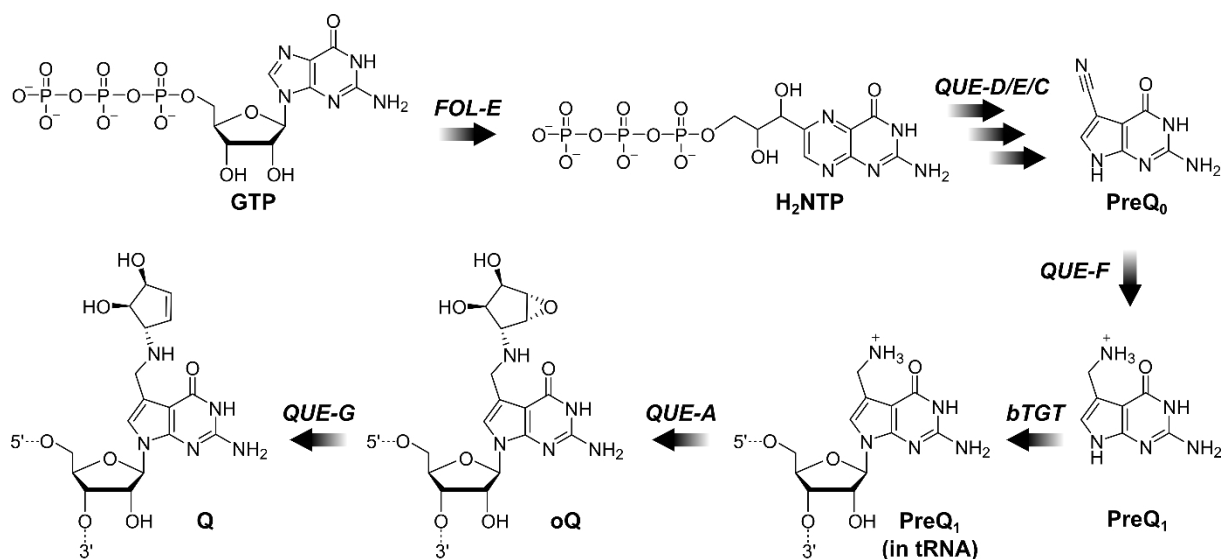
### Ribose-Methylierungen

Methylierungen der 2'-Hydroxygruppe der Ribose treten größtenteils in rRNA auf, können jedoch auch in einigen tRNA-Isoakzeptoren entweder zu Beginn der D-Schleife oder nahe des Anticodons, besonders an Position 32 inkorporiert werden (**Abbildung 1.7 C**).<sup>109–111</sup> tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> ist ein besonderes Beispiel, da hier mit Cm32 und Gm34 (2'-O-Methylguanosin) gleich zwei Ribose-Methylierungen in einem tRNA-Isoakzeptor vorhanden sind. Allgemein führt der Einbau einer Methylgruppe am 2'-Hydroxygruppe der Ribose zu einer C3'-*endo*-Konformation der Ribose, da in einer C2'-*endo*-Konformation der sterische Anspruch des 3'-Phosphat und der Base für eine Methylierung zu groß ist. Dieser Effekt tritt zwar insbesondere in Pyrimidinen auf, betrifft jedoch auch Purine.<sup>110, 112</sup> Im Fall von Gm18, welches in eukaryotischer tRNA<sup>Ser</sup><sub>UGA</sub> vorhanden ist, sorgt die entstehende C3'-*endo*-Konformation für mehr Starr-

heit und Stabilität des kompletten D-Arms.<sup>110, 113</sup> Im Anticodon könnte eine entsprechende Modifizierung durch Erzwingen der C3'-*endo*-Konformation, ähnlich wie die Wobble-Modifikationen für das korrekte Auslesen des mRNA Codons sorgen, indem die Anticodon-Schleife optimal ausgerichtet wird.<sup>114</sup> Außerdem tragen 2'-O-Methylierungen generell zu einer höheren Beständigkeit gegenüber hydrolytischer Spaltung bei. Eine unmodifizierte 2'-Hydroxygruppe könnte über einen internen nukleophilen Angriff auf das Phosphat-Rückgrat zu einem Strangbruch führen,<sup>115</sup> was durch eine Methylierung der 2'-Hydroxygruppe verhindert wird. Abgesehen von der Stabilisierung der Struktur konnten noch keine weiteren spezifischen Effekte der ribose-methylierten Modifikationen nachgewiesen werden. Eine Involvierung in diverse neurologische Krankheiten wurde jedoch bereits des Öfteren bestätigt.<sup>116</sup>

### 1.2.2 Queuosin – ein hypermodifiziertes Nukleosid

Das hypermodifizierte Guanosin-Analogon Queuosin ist eine der komplexesten bisher entdeckten RNA-Modifikationen.<sup>117</sup> Während Queuosin bereits 1968/1969 entdeckt wurde<sup>118–120</sup> und 1972 festgestellt werden konnte, dass sich dieses stets an Position 34 der Histidin, Asparagin, Aspartat und Tyrosin decodierenden tRNA-Isoakzeptoren befindet,<sup>121</sup> konnte die Struktur erst 1975 vollständig aufgeklärt werden.<sup>122</sup> An ein 7-Desaza-Guanosin wird über eine Aminomethyl-Seitenkette an Position 7 ein Cyclopentendiol-Derivat angehängt.<sup>123</sup> Während Queuosin als Name für das komplette Nukleosid gewählt wurde, bezeichnet Queuin (QBase, q) die entsprechende Nukleobase.



**Abbildung 1.8: Biosynthese von Queuosin in Prokaryoten.** Abkürzungen der Zwischenprodukte sind unter dem jeweiligen Molekül angegeben. Abkürzungen der beteiligten Enzyme sind kursiv über den Reaktionspfeilen angegeben.

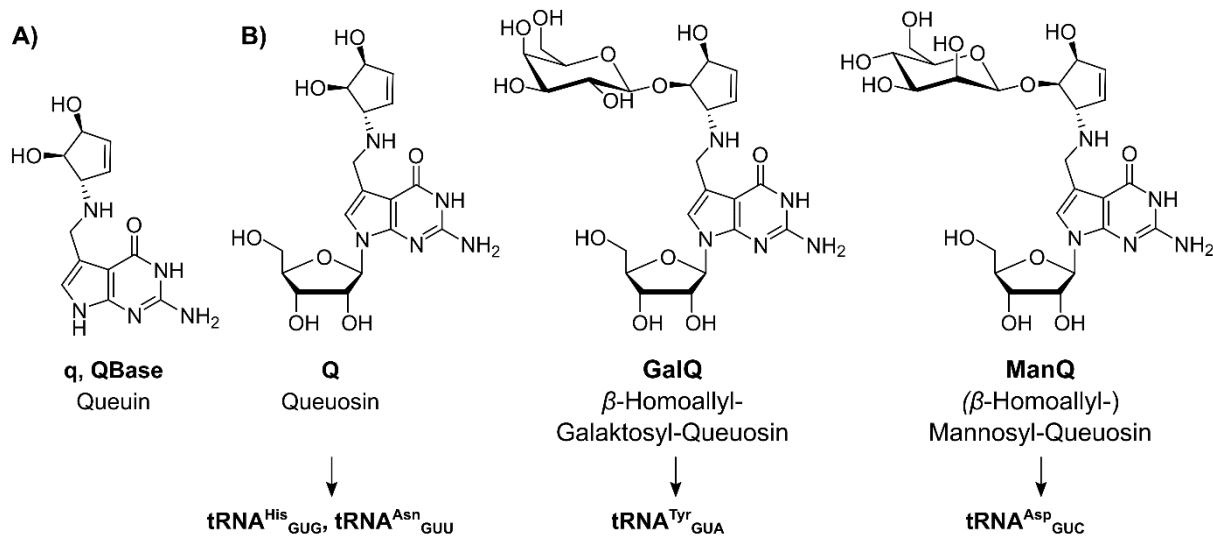
## 1.2 RNA-Modifikationen in Eukaryoten

Eukaryotische Zellen sind aufgrund fehlender Enzyme nicht in der Lage Queuin selbst zu synthetisieren und daher auf die Aufnahme entweder aus der Nahrung<sup>117, 124</sup> oder aus dem Mikrobiom<sup>125</sup> angewiesen. Aus diesem Grund wird Queuosin teilweise auch als Vitamin bezeichnet.<sup>126</sup> Die Biosynthese in Prokaryoten startet mit Guanosin-5'-triphosphat (GTP), welches in einer ersten Reihe von enzymatischen Reaktionen in das Vorläufer-Molekül preQ<sub>0</sub> umgewandelt wird.<sup>127, 128</sup> Dabei entsteht zuerst das Dihydroneopterintriphosphat (H<sub>2</sub>NTP), welches neben der dreistufigen Umsetzung zu preQ<sub>0</sub><sup>129–131</sup> auch als Zwischenprodukt des Folat- und Biotin-Stoffwechsels dient.<sup>132</sup> Durch eine NADPH-abhängige Reduktion wird die Nitrilgruppe des PreQ<sub>0</sub> anschließend zum Amin reduziert, um PreQ<sub>1</sub> zu erhalten.<sup>131, 133</sup> Dieses wird dann durch bakterielle tRNA-Guanin-Transglykosylasen (bTGT) an Position 34 der entsprechenden tRNA-Moleküle inkorporiert<sup>134, 135</sup> und erst dort in zwei weiteren Schritten zum endgültigen Queuosin modifiziert. Zuerst wird ein Cyclopentandiol-Epoxid angefügt, welches von entsprechend derivatisierter Ribose des S-Adenosylmethionins (SAM) bereitgestellt wird.<sup>136–138</sup> Als Zwischenprodukt entsteht Epoxy-Queuosin (oQ), welches in prokaryotischer tRNA<sup>Tyr</sup> direkt inkorporiert wird.<sup>139</sup> Für die Produktion von Queuosin dient Vitamin B12 in einer letzten Reaktion als Cofaktor für die Reduktion der Epoxygruppe.<sup>139</sup> Reguliert wird die *de novo* Biosynthese demnach unter anderem durch die Verfügbarkeit der Stoffwechselsubstrate GTP, SAM und Vitamin B12. Die finale Aufklärung des insgesamt achtstufigen Prozesses gelang erst 2011 mit der Entdeckung des letzten beteiligten Enzyms.<sup>136</sup> Eine grobe Übersicht der einzelnen Reaktionsschritte ist in **Abbildung 1.8** gegeben.

Außerdem kann Queuosin durch Anfügen zusätzlicher Gruppen weiter modifiziert werden. In Prokaryoten vertreten sind die Modifikationen Epoxy-Queuosin (oQ) und Glutamyl-Queuosin (GluQ).<sup>139, 140</sup> Während oQ ein direkter Vorläufer des finalen Queuosins ist,<sup>136, 141</sup> wird für GluQ nach vollständiger Biosynthese von Queuosin auf dieses noch eine zusätzliche Glutamyl-Gruppe übertragen. Über welche der beiden Hydroxygruppen der Cyclopentandiol-Gruppe die Veresterung abläuft konnte noch nicht geklärt werden. GluQ und oQ konnten in Eukaryoten zwar bisher nicht nachgewiesen werden, stattdessen treten dort aber die Modifikationen Galaktosyl-Queuosin (GalQ) und Mannosyl-Queuosin (ManQ) auf (**Abbildung 1.9**).<sup>142, 143</sup> Entsprechenden Enzyme zur Übertragung des Zuckers wurden bisher für keine der Q-Modifikationen entdeckt. Zudem stellt sich auch hier die Frage nach der Position der Glykosylierung. Der entsprechende Zucker kann über eine  $\alpha$ - oder  $\beta$ -glykosidische Bindung entweder an die homoallylische oder die allylische Hydroxygruppe angefügt werden. Während schon früh postuliert wurde, dass die Verknüpfung stets über eine  $\beta$ -glykosidischen Bindung an der homoallylischen Hydroxygruppe erfolgt,<sup>143</sup> konnte in der Dissertation von Peter Thumbs aus der Arbeitsgruppe



um Prof. Dr. Thomas Carell ebendiese Struktur nur für das  $\beta$ -Galaktosyl-Queuosin bestätigt werden.<sup>144</sup> Dieselbe Gruppe forscht indessen an der korrekten Struktur des Mannosyl-Derivates. Durch die Arbeit von Timm Ensfielder aus derselben Forschungsgruppe konnte bereits bestätigt werden, dass es sich beim angefügten Zucker tatsächlich um eine Mannose handelt.<sup>145</sup> Die Experimente legen jedoch eine  $\alpha$ -glykosidische Bindung zur Cyclopentendiol-Gruppe nahe. Eine Publikation zur tatsächlichen Struktur wird noch im Jahr 2021 erwartet (Hillmeier *et al.*).



**Abbildung 1.9: Queuin (A) und in Eukaryoten vertretene Queuosin-Derivate (B)**

Alle Derivate haben gemeinsam, dass sie lediglich in spezifischen tRNA-Isoakzeptoren vorhanden sind. In eukaryotischen Zellen ist nicht weiter modifiziertes Queuosin in tRNA<sup>Asn</sup><sub>GUU</sub> und tRNA<sup>His</sup><sub>GUG</sub> vorzufinden, während GalQ in tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub> und ManQ in tRNA<sup>Asp</sup><sub>GUC</sub> inkorporiert wird.<sup>142, 143, 146</sup> All diese tRNA-Isoakzeptoren besitzen ein GUN-Anticodon, wobei für N jedes beliebige Nukleotid eingesetzt werden kann. Je nach Nukleosid an dieser Position wird die Identität der zu inkorporierenden Aminosäure bestimmt. Das entsprechende Queuosin-Derivat ist in diesen tRNA-Isoakzeptoren stets an der Wobble-Position (34) anstelle von G vorzufinden.<sup>121</sup>

Während eine *de novo* Biosynthese in Eukaryoten nicht möglich ist, reicht die Aufnahme von Queuin über die Nährstoffe aus, um die Inkorporation der Queuosin-Modifikationen in tRNA-Moleküle zu gewährleisten. Dies kann durch die Aufnahme von Nährstoffen über die Nahrung oder symbiotisch über die Darmflora erfolgen. In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der freien Base Queuin zum Medium einen Anstieg der Q-Modifikationen bewirkt.<sup>23</sup> In Säugetieren wird Queuin über einen bisher nicht bestimmten Transport-Mechanismus vom extrazellulären Raum in das Zytosol transportiert.<sup>147–150</sup> Die Aufnahme anderer

## 1.2 RNA-Modifikationen in Eukaryoten

Queuosin-Formen wie Queuosin-5'-Phosphat, Queuosin-3'-Phosphat oder dem Nukleosid Queuosin erscheint ebenfalls möglich, konnte bisher jedoch nicht belegt werden. Aufgrund des Umsatzes von tRNA-Molekülen wurde sowohl das freie Nukleosid als auch die beiden phosphorylierten Formen in der Zelle vorgefunden, konnten allerdings noch nicht mit einer physiologischen Wirkung in Verbindung gebracht werden. Bei der Degradation von tRNA-Molekülen entsteht beispielsweise Queuosin-5'-Phosphat, über welches in Eukaryoten – durch einen effizienten Rückgewinnungsmechanismus – anschließend wieder Queuin gewonnen werden kann.<sup>149, 151, 152</sup> In Bakterien ist ein solcher Mechanismus aufgrund der alternativen Möglichkeit einer *de novo* Biosynthese nicht vorhanden. Trotz der Konservierung über alle Domänen des Lebens kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Erweiterung des Epitranskriptoms um die Q-Modifikationen in den verschiedenen Organismen evolutionär unabhängig voneinander erfolgte.

Ähnlich wie bei Prokaryoten wird der Einbau von Queuin in Eukaryoten von einer (eukaryotischen) tRNA-Guanin-Transglykosylase (eTGT), ebenfalls Queuine-tRNA-Ribosyltransferase genannt, durchgeführt.<sup>153–156</sup> Im Gegensatz zu Prokaryoten – in denen sich das Enzym aus zwei homodimeren Untereinheiten zusammensetzt – bildet sich die eukaryotische Variante aus zwei heterodimeren Untereinheiten.<sup>156–158</sup> Durch die Einführung gezielter Mutationen in das Substrat tRNA<sup>Tyr</sup> konnte gezeigt werden, dass die Sequenz U33-G34-U35 in der Anticodon-Schleife als Erkennungsmerkmal dient.<sup>159</sup> Weiterführende Maus-Studien konnten belegen, dass die Positionen 36, 37 und 38 sowohl einen Einfluss auf die Modifizierung mit Queuosin als auch auf dessen weitere Modifizierung haben.<sup>160</sup>

### 1.2.3 Biologische Funktionen von Queuosin-Derivaten

Eine der wichtigsten Funktionen von Queuosin und seinen Derivaten ist der Einfluss auf Wobble-Basenpaarungen zwischen dem Anticodon der tRNA-Isoakzeptoren und den entsprechenden Codonen der mRNA.<sup>23, 24</sup> So konnte gezeigt werden, dass das GUN-Anticodon – welches in den Isoakzeptoren tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Tyr</sup> vertreten ist – bei der Anwesenheit von Q statt G an der Wobble-Position nicht nur mit dem reverse komplementären Codon NAC paart, sondern zusätzlich in der Lage ist das Codon NAU zu decodieren. Somit wird für die Decodierung beider mRNA-Codone nur ein einzelner tRNA-Isoakzeptor benötigt.<sup>24, 161–163</sup> In HeLa-Zellen werden alle Codone schneller abgelesen, als es durch das kanonische Anticodon der Fall wäre, wobei das NAU-Codon von diesem Effekt meist stärker betroffen ist. Dies entspricht den Erwartungen, da eine Watson-Crick-Basenpaarung zwischen dem NAC-Codon und dem GUN-Anticodon selbst ohne Modifizierung durch Q möglich ist, für das



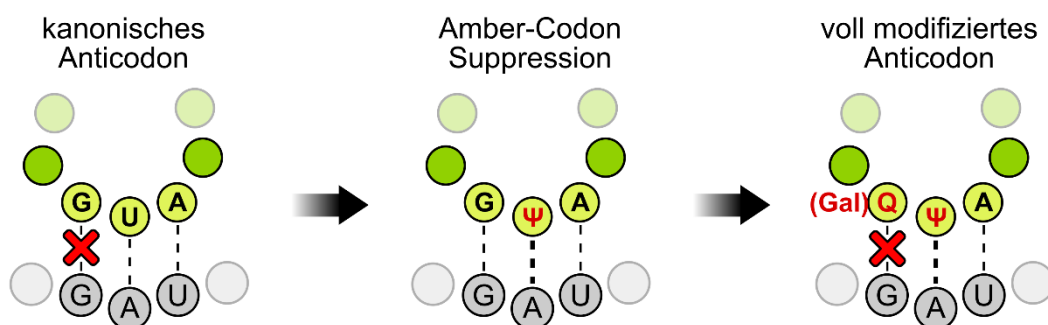
Ablesen des NAU-Codons ist die entsprechende Modifizierung jedoch zwingend erforderlich. Lediglich in tRNA<sup>Asp</sup> konnte ein stärkerer Effekt auf das NAC-Codon festgestellt werden.<sup>23</sup> Auch in *Schizosaccharomyces pombe* konnten Auswirkungen der Q-Inkorporation in das Anticodon auf die Basenpaarung mit den entsprechenden Codonen festgestellt werden; dort waren die Ergebnisse jedoch weitaus heterogener ausgeprägt.<sup>24</sup> In allen Fällen wurde das Nicht-Watson-Crick-Basenpaar nach dem Einbau des entsprechenden Q-Derivats jedoch besser als zuvor gebildet. Somit wird das Gleichgewicht in Richtung des NAU-Codons verschoben, was einer Äquilibrierung beider Codone gleichkommt. Bei der Injektion von *drosophila melanogaster* tRNA<sup>His</sup> in *Xenopus* Oozyten war dieser Effekt so stark ausgeprägt, dass Queuosin-modifizierte tRNA-Moleküle eine Präferenz gegenüber dem NAU-Codon zeigten.<sup>164</sup>

Zudem könnte Queuosin zur Stabilität von tRNA-Molekülen beitragen. In keimfreien Mäusen wurde untersucht, wie sich eine spezielle Queuine-freie Diät auf die jeweiligen Modifikationen in den entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren auswirkt. Interessanterweise sank das Level von nicht weiter modifiziertem Queuosin in tRNA<sup>Asn</sup> und tRNA<sup>His</sup> um ~ 80 % ab, wohingegen die Level von ManQ und GalQ in tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Tyr</sup> nahezu unverändert blieben.<sup>124, 165</sup> Erst nach einjährigem Entzug von Queuin, konnte kein Q-Derivat mehr nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die Relevanz der Wiedergewinnung von Queuin aus degradierten tRNA-Molekülen und bedarf zum genaueren Verständnis eingehendere Untersuchungen der beteiligten Enzyme. Erstaunlicherweise war der einzige phänotypische Effekt der Queuin-Diät jedoch eine verminderte Fortpflanzungsfähigkeit.<sup>124, 165</sup> Anhand derselben Mäuse konnte gezeigt werden, dass bei Fütterung von Queuin nach längerem Entzug der Einbau von ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> gegenüber den anderen Q-Derivaten priorisiert wird; hier stiegen die Level schneller wieder an.<sup>124</sup> Ebenfalls konnte eine Abhängigkeit zwischen der Abundanz von Q-Modifikationen und dem Alter von Mäusen festgestellt werden. In neugeborenen Mäusen wurde ein verringertes Level der Q-Modifikationen vorgefunden, was auf das schnelle Wachstum und dem damit einhergehenden großen Bedarf an Queuin zurückgeführt wurde.<sup>145</sup> Dabei waren die glykosylierten Q-Derivate gegenüber unmodifiziertem Q weniger starken Schwankungen ausgesetzt, was erneut für die Priorisierung von ManQ und GalQ spricht. Ein ähnlicher Effekt konnte in *Dictyostelium discoideum* beobachtet werden. Unter Anwesenheit von Queuin im Kulturmedium sank bei einem Stopp der RNA-Synthese durch Actinomycin C nur das Level der Isoakzeptoren tRNA<sup>Asn</sup> und tRNA<sup>His</sup>. Wurde das gleiche Experiment jedoch ohne die Supplementierung von Queuin durchgeführt, sank die Abundanz aller Q-abhängigen tRNA-Isoakzeptoren.<sup>166</sup> Dies deutet ebenfalls auf eine Priorisierung der tRNA-Moleküle mit glykosylierten Q-Derivaten hin.

## 1.2 RNA-Modifikationen in Eukaryoten

Des Weiteren wird vermutet, dass die Q-Modifikationen als Erkennungsmotiv für bestimmte Enzyme dienen. Durch Sequenzierung konnte in Zellkultur bei der Zugabe von Queuin zum Medium ein Anstieg von m<sup>5</sup>C38 in tRNA<sup>Asp</sup> beobachtet werden. Dieses wird von DNMT2 inkorporiert und schützt das tRNA-Molekül vor einem stress-induzierten Abbau durch die RNase Angiogenin.<sup>167</sup> So konnte bei einem Gen-Knockout von DNMT2 und NSUN2 ein verringertes Level an tRNA<sup>Asp</sup> festgestellt werden.<sup>90</sup> Der genaue Einfluss von ManQ auf die Methylierungsreaktion konnte noch nicht aufgeklärt werden, es wird jedoch vermutet, dass die Anwesenheit von ManQ eine Konformationsänderung im Anticodon hervorruft, welche DNMT2 wiederum einen besseren Zugang zu C38 verschafft.<sup>168, 169</sup> Das aktive Zentrum des Enzyms ist dann zwar vergleichsweise weit von ManQ entfernt, die Konformationsänderung könnte aber ebenso zu einer Stabilisierung eines instabilen Übergangszustandes führen und die Enzymkinetik somit erhöhen.<sup>168, 170</sup>

Zuvor wurde bereits erwähnt, dass Ψ durch das zusätzlich verfügbare N1-Wasserstoffatom und den daraus resultierenden besseren Basenstapelungseigenschaften, einen positiven Einfluss auf die Stabilität von RNA-Doppelsträngen zeigt.<sup>61, 171</sup> Durch den gleichen Effekt wird die Codon-Anticodon-Basenpaarung im Isoakzeptor tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub> durch den Einbau von Ψ35 verstärkt.<sup>61</sup> Somit werden nicht nur die entsprechenden Tyrosin-codierenden Basentriplets UAU und UAC ausgelesen, sondern auch die Decodierung des Amber-Stopp-Codons UAG ermöglicht.<sup>172, 173</sup> Dabei bildet sich eine durch Ψ-induzierte G:G-Basenpaarung aus, welche durch eine Rotation des Guanosins von der *anti*- in die *syn*-Konformation ermöglicht wird.<sup>174</sup> Wird dieses Stopp-Codon von tRNA<sup>Tyr</sup> ausgelesen, kommt es nicht, wie durch den genetischen Code vorgegeben zu einem Translations-Stopp, sondern zum Einbau von Tyrosin und somit zu einer mutierten Variante des entsprechenden Proteins. Um dies zu verhindern wird an der Wobble-Position die GalQ-Modifikation inkorporiert, welche durch die Cyclopentendiol-Gruppe eine Rotation in



**Abbildung 1.10: Modifikationen im Anticodon von tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub> und deren Auswirkung auf die Basenpaarung.** Modifikationen im Anticodon (hellgrün) sind rot hervorgehoben. Rotes Kreuz = keine Basenpaarung mit dem mRNA-Codon (grau) möglich.

die *syn*-Konformation blockiert und die Basenpaarung zum Amber-Stopcodon somit unterbindet (**Abbildung 1.10**).<sup>171, 175</sup>

Außerdem scheint Queuosin in den Tyrosin-Stoffwechsel involviert zu sein. Säugetiere sind in der Lage Tyrosin aus der essenziellen Aminosäure Phenylalanin zu synthetisieren. Die nötige Hydroxylierung des aromatischen Rings wird über das Enzym Phenylalanin Hydroxylase (PAH) katalysiert, welches vom Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) abhängig ist.<sup>176–179</sup> Eine Tyrosin- und Queuin-freie Diät in keimfreien Mäusen wirkt letal mit Symptomen wie erschwerte Atmung und Krampfanfälle. Allein durch die Zugabe von Queuin konnten jedoch alle beobachteten Effekte unterbunden werden.<sup>125</sup> Die Anwesenheit von Queuin scheint für die Biosynthese von Tyrosin aus Phenylalanin daher notwendig zu sein. Zusätzlich wurde kontrolliert, ob Queuin selbst an der Reaktion beteiligt ist, oder der Einbau von Queuin in tRNA-Moleküle erforderlich ist. In einem Mausmodell mit defekter eTGT – welche die Inkorporation von Queuosin übernimmt – konnte gezeigt werden, dass die Tyrosin-Biosynthese trotz Anwesenheit von Queuin beeinträchtigt ist. Bei Fehlen von eTGT waren die BH<sub>4</sub>-Werte stark verringert, während die Werte der oxidierten Form BH<sub>2</sub> stark anstiegen.<sup>180</sup> Dementsprechend scheint der Einbau von Queuosin für die Reduktion von BH<sub>2</sub> zu BH<sub>4</sub> entscheidend zu sein. Nichtsdestotrotz konnten bei Tyrosin-freier Diät keine der zuvor beobachteten Symptome festgestellt werden. Schon zuvor war bekannt, dass Queuosin einen positiven Effekt auf die Aktivität diverser antioxidativer Enzymen hat,<sup>181</sup> die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch unerforscht.

### 1.3 Dynamik des Modifikationsprofils

#### 1.3.1 Writer, Eraser und Reader

Wie bereits zuvor besprochen sind RNA-Modifikationen besonders häufig in funktionellen RNA-Molekülen wie tRNA und rRNA vorzufinden. Dort sind diese maßgeblich an der Biogenese, Funktionalität und Stabilität der RNA beteiligt. Für einige Modifikationen hat sich dabei herausgestellt, dass diese nicht stöchiometrisch und statisch, sondern partiell und dynamisch inkorporiert werden. Das heißt, dass bestimmte Modifikationen nur in einem gewissen Anteil der entsprechenden RNA-Moleküle vorhanden sind und die Menge dort dynamisch hoch- oder herunterreguliert werden kann. Das Level einiger Modifikationen kann demnach situationsabhängig angepasst werden und ist für die biologische Regulation der Zellabläufe von Relevanz. So konnte über Sequenzierung beispielsweise eine teilweise Modifizierung diverser Positionen von m<sup>1</sup>A, N1-Methylguanosin (m<sup>1</sup>G) und N3-Methylcytidin (m<sup>3</sup>C) in tRNA festgestellt werden.<sup>182</sup> Die Inkorporation in tRNA-Moleküle scheint dabei stressabhängig zu sein. In Hefe konnte für die Modifikationen m<sup>5</sup>C, Cm und m<sup>22</sup>G unter diversen Stressbedingungen schon zuvor eine Regulation beobachtet werden, wobei sich kein einheitliches Bild beim Trend der Modifikationslevel ergab.<sup>85, 183</sup>

Ein konkreteres Beispiel wäre die ebenfalls zuvor bereits angeschnittene Inkorporation der Ψ-Modifikation: Über die Pseudouridin-Synthase (PUS) wird dabei die C-N-glykosidische Bindung der Nukleobase des Uridins zur Ribose gelöst, das Uracil anschließend um die eigene N3-C6-Achse gedreht und schließlich über eine nun C-C-glykosidische Bindung wieder mit der Ribose verbunden.<sup>21</sup> Die PUS-Enzyme, sowie alle weiteren RNA-modifizierenden Enzyme, sind sogenannte „Writer“. Diese sind für die Inkorporation der jeweiligen Modifikationen in RNA-Moleküle zuständig. Die in RNA-Molekülen anwesende Menge an Ψ wird demnach mitunter durch die Enzyme der PUS-Familie reguliert, welche durch Hitzeschock induziert werden können.<sup>184</sup> Erneut zeigt sich also, wie die Zelle durch Regulation des Modifikationsprofils auf Stressfaktoren reagieren kann.

Ein weiterer wichtiger Writer für die Modifizierung von tRNA-Molekülen ist NSUN2. Für dieses konnte die Inkorporation der m<sup>5</sup>C-Modifikation nicht nur an den Positionen 34, 40 und 48–50 diverser tRNA-Isoakzeptoren nachgewiesen werden, sondern auch in bis zu 300 verschiedenen mRNAs.<sup>185–187</sup> Darüber hinaus kann m<sup>5</sup>C durch Enzyme der TET-Familie weiter zu 5-Hydroxymethylcytidin (hm<sup>5</sup>C) oxidiert werden, welches besonders in DNA regulatorische

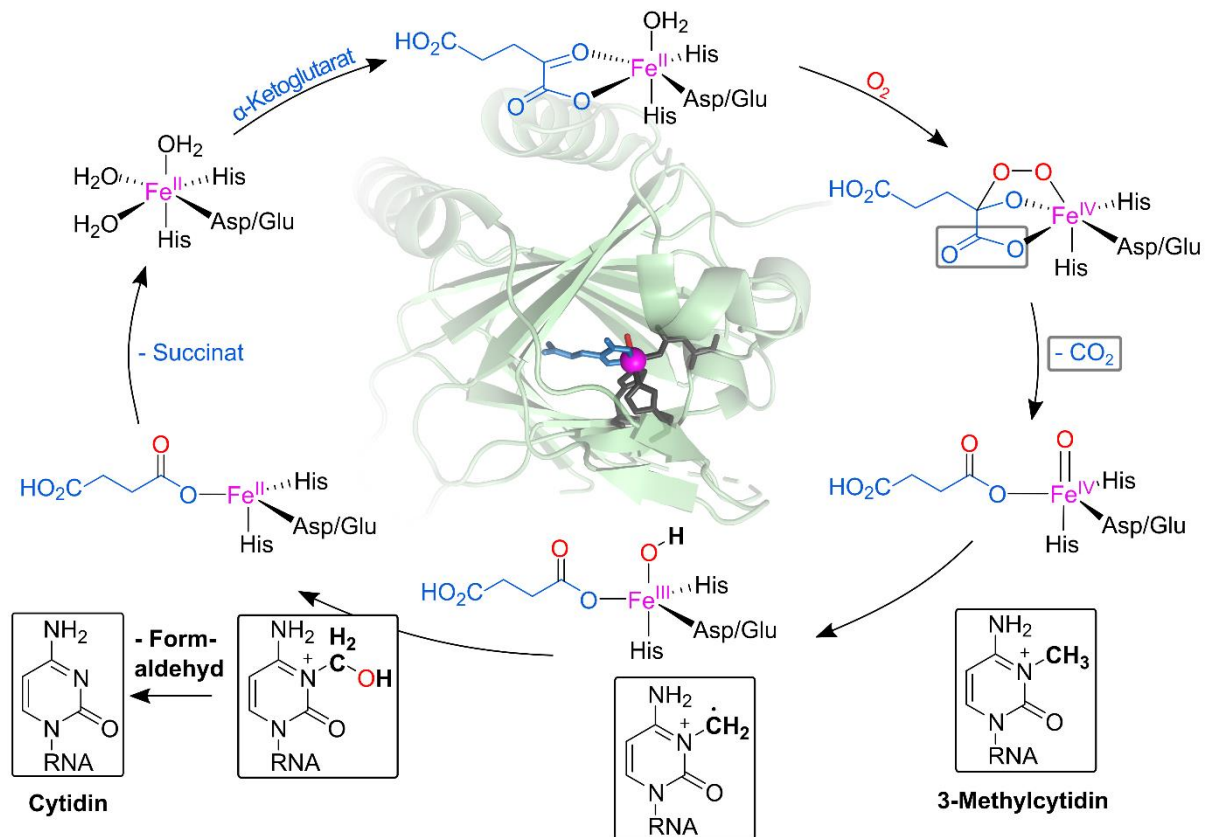
Funktionen besitzt, allerdings auch in RNA nachgewiesen werden konnte.<sup>188, 189</sup> Für die Inkorporation von m<sup>6</sup>A in mRNA ist ein heterodimerer Komplex aus den Enzymen METTL3 und METTL14 (engl.: Methyltransferase-like) zuständig. Durch den Einbau wird unter anderem der Reparaturmechanismus von durch UV-Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schäden beschleunigt.<sup>190</sup> Die Inkorporation von m<sup>3</sup>C in tRNA-Moleküle wird dagegen von METTL6 durchgeführt. Die Diversität der Writer-Enzyme ist nahezu so groß wie die der RNA-Modifikationen. Obwohl bereits viele Writer identifiziert werden konnten, sind die verantwortlichen Enzyme für einige Modifikationen noch unbekannt. Zudem sind die genauen molekularen Mechanismen – die Ursachen und Auswirkungen – der Inkorporation von Modifikationen oftmals noch nicht gänzlich erforscht.

Das Gegenstück zu den Writern sind die „Eraser“. Diese entfernen Modifikationen von den RNA-Molekülen und sorgen somit für die Wiederherstellung des kanonischen Nukleosids. Hierfür sind mehrere Mechanismen wie beispielsweise Basen- oder Nukleosid-Exzisionsreparatur (BER oder NER) denkbar. Auch ein Abbau der modifizierten RNA-Moleküle ist denkbar und trägt zu einem gewissen Maße sicherlich zur Abnahme der Modifikationsdichte bei. Der Großteil der aktiven Demodifizierung im Menschen beruht auf der oxidativen Decarboxylierung der entsprechenden Methylgruppen durch Familienmitglieder der ALKBH-Enzyme. Von diesen humanen Homologen der bakteriellen Eisen(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase AlkB existieren insgesamt 9 Familienmitglieder (ALKBH1–8 und FTO). Unter Einbezug von  $\alpha$ -Ketoglutarat und einem Sauerstoff-Molekül wird das Eisen(II)-Ion im katalytischen Zentrum des Enzyms zu einem hochreaktiven Eisen(IV)-Oxo-Komplex oxidiert, welcher anschließend durch die Übertragung einer Hydroxygruppe auf die Methylgruppe des modifizierten Nukleosids eine Abspaltung ebendieser Gruppe als Formaldehyd katalysiert (**Abbildung 1.11**).<sup>191, 192</sup> Dieser Mechanismus wirkt vorrangig an N-methylierten Nukleosiden.

ALKBH1, welches für die Demethylierung von m<sup>1</sup>A58 in tRNA-Molekülen verantwortlich sein soll, konnte als erster humaner Eraser identifiziert werden.<sup>193</sup> Durch die Entfernung von m<sup>1</sup>A58 wird die Menge an anwesenden tRNA<sup>iMet</sup>-Molekülen angepasst und somit die Initiation der Translation reguliert. Ebenso wird die Elongation beeinflusst, indem die Affinität weiterer tRNA-Isoakzeptoren zum Elongationsfaktor eEF1A erhöht wird.<sup>193</sup> Die zellulären Ziele der verwandten Demethylase ALKBH3 konnten noch nicht abschließend bestimmt werden.<sup>194, 195</sup> Während die entsprechenden Writer für die meisten RNA-Modifikationen bereits bekannt sind, ist der Forschungsbereich um Eraser noch vergleichsweise jung. Beide Enzymklassen greifen

### 1.3 Dynamik des Modifikationsprofils

in die gezielte Anpassung des Modifikationsprofils ein und könnten somit für die Anwendung in Forschung und Medizin in Zukunft von hoher Relevanz sein.



**Abbildung 1.11: Mechanismus von Eisen(II)/α-Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.** Mittig ist das Enzym ALKBH3 mit Fokus auf das katalytische Zentrum abgebildet. Der Mechanismus der oxidativen Decarboxylierung ist anhand der Demethylierung von 3-Methylcytidin (m<sup>3</sup>C, schwarze Kästen) gezeigt.

Das Zusammenspiel von Writern und Erasern ist äußerst dynamisch und wird von der Zelle stets an interne und externe Einflüsse angepasst. So entsteht für jedes RNA-Molekül ein auf die jeweilige Situation speziell angepasstes Modifikationsprofil. Einzelne Modifikationen können dann von „Readern“ erkannt werden, welche eine entsprechende molekulare Reaktion einleiten. So ist es beispielsweise möglich, dass eine enzymatische Reaktion nur in Anwesenheit einer bestimmten Modifikation stattfindet. Hier beschränkt sich der Fortschritt der Forschung bisher größtenteils auf Effekte in mRNA-Molekülen. Die m<sup>6</sup>A-Modifikation rekrutiert beispielsweise Proteine der YTH-Domänenfamilie, welche dann eine Regulation der prä-mRNA-Prozessierung, der Translationsinitiation und des mRNA-Zerfalls bewirken.<sup>196</sup> Die Modifikation m<sup>5</sup>C dagegen wird vom mRNA-Exportadapterprotein ALYREF erkannt, was auf eine Rolle beim Export aus dem Nukleus hinweist.<sup>197</sup>



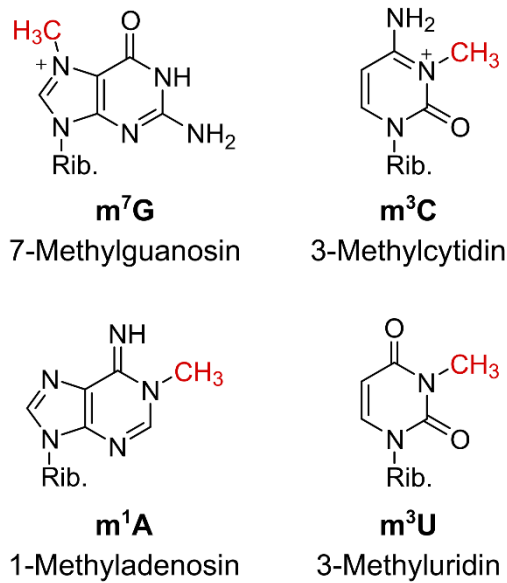
### 1.3.2 Verschiedene Stressfaktoren

Das Modifikationsprofil von RNA-Molekülen – wie es von Writer- und Eraser-Enzymen abhängig von zellulären (endogenen) und externen (exogenen) Einflüssen aufgebaut wird – stellt sicher, dass die molekularen Mechanismen entsprechend der Situation angepasst werden. Im Menschen wird Zellstress beispielsweise durch energiereiche Strahlung wie UV-Licht ausgelöst,<sup>198</sup> kann aber auch durch Infektionen<sup>199</sup> oder durch physischen oder psychischen Stress entstehen.<sup>200</sup> Auf molekularer Ebene äußert sich dies meist durch chemische Modifizierung diverser, in der Zelle befindlicher Makromoleküle. Besonders kritisch sind derartige Schäden an der DNA. Werden diese nicht von der Zelle erkannt und entsprechend entfernt, kann das der Auslöser für verschiedene Krebsarten sein.<sup>201</sup> Aber auch Lipide und Proteine können geschädigt werden,<sup>202</sup> der Fokus dieser Arbeit soll jedoch selbstverständlich auf entstehenden RNA-Schäden liegen.

Ein endogener Faktor, der das Modifikationsprofil beeinflusst, sind in der Zelle entstehende reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS). Diese führen zu Schäden in RNA-Molekülen, indem die Nukleoside oxidiert werden. Ein häufig in der Zelle vorkommender Methylgruppen-Donor ist dagegen der Cofaktor SAM, welcher bei hohen Konzentrationen spontane, ungewollte Methylierungen auslösen könnte.<sup>203</sup> Exogene Faktoren sind äußerst vielfältig und reichen von UV-Strahlung über andere Umwelteinflüsse wie Infektionen bis hin zur direkten Schädigung durch diverse Reagenzien/Chemikalien. Teilweise kann eine solche Schädigung auch erwünscht sein, wie es beispielsweise bei einigen Chemotherapeutika der Fall ist. Diese führen oftmals zu Methylierungen (z.B. Temozolomid) und führen somit zur gezielten Apoptose der entsprechenden Tumor-Zellen.<sup>204</sup>

Besonders anfällig gegenüber methylierenden Agenzien sind die Ringstickstoffe der Nukleobase, jedoch können auch exozyklische Amine oder Ketogruppen betroffen sein. Diese sind besonders nukleophil und stellen daher ein geeignetes Ziel für Methylgruppen-Donoren dar. Durch das methylierende Agens Methylmethansulfonat werden in RNA so besonders die Nukleoside  $m^7G$ ,  $m^1A$ ,  $m^3C$  und  $m^3U$  gebildet (**Abbildung 1.12**). Gerade Methylierungen der Ringpositionen N1, und N3 sind dabei problematisch, da diese oftmals an der Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren beteiligt sind, welche nach einer entsprechenden Methylierung somit unterbunden wird. Eine genauere Untersuchung von Methylierungsschäden erscheint daher sinnvoll. In Eukaryoten besteht eine Problematik jedoch darin, dass nahezu alle methylierten

### 1.3 Dynamik des Modifikationsprofils



**Abbildung 1.12: Häufig in RNA auftretende Schäden durch alkylierende Agenzien.** Der Schaden ist jeweils als rote Methylgruppe dargestellt.

Nukleoside ebenso ein natürliches Vorkommen aufweisen. Somit ist eine Differenzierung zwischen von der Zelle gewollter, enzymatischer Methylierung und Schäden, welche durch ungewollte Methylierung eingeführt werden, schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem durch Isotopenmarkierung gelöst: Durch Zugabe von D<sub>3</sub>-Methionin zum Zellkulturmedium werden alle enzymatisch gebildeten Modifikationen isotopenmarkiert, während Methylgruppen, welche durch die direkte Methylierung ausgehend von MMS entstehen, unmarkiert bleiben.

Allgemein sind die Folgen solcher Schäden an RNA-Molekülen äußerst divers. Oftmals beruhen

diese auf der Unterbindung von Basenpaarungen und sind Auslöser von Krankheiten wie Krebs oder neurologischen Defekten. Aufgrund der hohen Exposition gegenüber diversen Stressoren hat die Zelle daher mehrere Mechanismen entwickelt, um DNA- und RNA-Schäden zu reparieren. Schon länger bekannt sind Mechanismen wie die homologe Rekombination oder die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) bei DNA-Doppelstrangbrüchen. Auch Nukleotid- oder Basen-Exzisionreparatur wird von der Zelle regelmäßig verwendet,<sup>205</sup> es existieren jedoch auch Reparaturmechanismen, welche direkt am Schaden angreifen und diesen enzymatisch entfernen. Unter diese Kategorie fallen zum Beispiel die zuvor bereits besprochenen Eraser-Enzyme der ALKBH-Familie.<sup>205</sup> Während viele dieser Dioxygenasen aufgrund ihrer enzymatischen Demethylierung von DNA entdeckt wurden, wird nach und nach auch deren Aktivität gegenüber RNA-Modifikationen – seien diese enzymatisch gewollt oder durch einen Schaden entstanden – berichtet.<sup>206</sup>

#### 1.3.3 Korrelationen zu humanen Krankheiten

Das Modifikationsprofil von RNA-Molekülen bestimmt die molekularen Mechanismen maßgeblich. Daher ist es nicht verwunderlich, dass bei Defekten der Writer- oder Eraser-Enzyme bestimmte Zellvorgänge fehlerhaft ablaufen. Dies führt oftmals zu definierten Phänotypen, welche sich im Menschen nicht selten in diversen Krankheiten äußert, darunter Krebs, neurologische und mitochondriale Störungen. Viele Modifikationen wurden zwar schon mit bestimmten Krankheiten in Verbindung gebracht, deren vollständige Pathologie konnte meist jedoch noch



nicht geklärt werden. Zum besseren Verständnis der Krankheitsauslöser und den damit verbundenen Therapiemöglichkeiten sind weiterführende Studien daher essenziell. Diese werden nicht nur zum Verständnis der biologischen Regulation beitragen, sondern auch das Verständnis von menschlicher Gesundheit und Krankheit im Kontext von RNA-Modifikationen fördern.

Die Diversität der möglichen Krankheiten ist durch die hohe Anzahl an Modifikationen äußerst hoch. In **Tabelle 1.1** wird eine Zusammenfassung der Korrelation zwischen in tRNA häufig vertretenen Modifikationen und den entsprechend diagnostizierten Krankheiten gegeben. Dabei ist jeweils das involvierte Enzym angegeben. Oftmals handelt es sich dabei um Writer-Enzyme, teilweise – beispielsweise im Falle von FTO – aber auch um die entsprechenden Eraser-Enzyme. Die Informationen wurden Jonkhout *et al.*<sup>207</sup> entnommen. Dort, aber auch in Barbieri *et al.*<sup>208</sup> und darüber hinaus in vielen weiteren Review-Artikeln sind weitaus mehr Modifikationen und deren Korrelationen zu humanen Krankheiten tabellarisiert.

**Tabelle 1.1: Korrelationen von tRNA-Modifikationen und Krankheiten.**

Modifikation	assoziierte Krankheit	Enzym	Quellen
mcm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	Blasenkrebs Brustkrebs	ALKBH8 ELP3	<a href="#">209, 210</a> <a href="#">211</a>
m <sup>5</sup> U	Brustkrebs	TRMT2A	<a href="#">212</a>
ψ	Dyskeratosis congenita Laktatazidose	DKC1 PUS1	<a href="#">213–215</a>
m <sup>3</sup> C	Brustkrebs Lungenkrebs	METTL6 METTL6	<a href="#">216</a> <a href="#">217</a>
m <sup>5</sup> C	autosomal-rezessive geistige Behinderung Dubowitz-Syndrom Noonan-Syndrom	NSUN2 NSUN2 NSUN2	<a href="#">218, 219</a> <a href="#">220</a> <a href="#">221</a>
m <sup>1</sup> G	Diabetes II	TRMT10A	<a href="#">222, 223</a>
m <sup>7</sup> G	geistige Behinderung	WDR4	<a href="#">224</a>
m <sup>22</sup> G	geistige Behinderung	TRMT1	<a href="#">225</a>
m <sup>2</sup> G	Prostatakrebs	TRMT11	<a href="#">226, 227</a>
m <sup>1</sup> A	Mitochondriopathie	TRMT10C	<a href="#">228</a>
m <sup>6</sup> A	Brustkrebs Leukämie Prostatakrebs	FTO FTO FTO	<a href="#">229</a> <a href="#">230</a> <a href="#">231</a>

### 1.4 Detektionsverfahren für RNA-Modifikationen

#### 1.4.1 Arten von Detektionsmethoden

Um ein besseres Verständnis der molekularen Ursachen und Auswirkungen von RNA-Modifikationen zu erhalten, und somit deren Zusammenhang zu menschlichen Krankheiten zu verstehen, benötigen Wissenschaftler geeignete Detektionsmethoden. Mit am häufigsten verwendet wird dabei Massenspektrometrie und Sequenzierung. Diese Technologien erfreuen sich großer Beliebtheit in der Nukleinsäure-Analytik, wobei beide Vor- und Nachteile aufweisen, welche die jeweils andere Methode größtenteils in der Lage ist zu kompensieren. Ein Einsatz der zwei Techniken zusammen ist für die meisten Projekte daher vorteilhaft.<sup>232</sup> Sequenzierung bietet den Vorteil, dass die Sequenzinformation erhalten bleibt und ermöglicht somit eine eindeutige Positions-Zuordnung der entsprechenden Modifikation im Transkriptom. Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass strukturell ähnliche Modifikationen oftmals nicht voneinander unterschieden werden können. Hier greift die Massenspektrometrie ein: Über hochauflösende als auch über Tandem-Massenspektrometrie kann die Identität einer Modifikation zumeist ohne Zweifel bestimmt werden. Die Position im Transkriptom könnte zwar theoretisch über Oligonukleotid-MS festgestellt werden, ist aber noch nicht so zuverlässig und praktikabel wie die Bestimmung über Sequenzierung. Neue Methoden für die Analyse von Oligonukleotiden über Massenspektrometrie sind zwar auf dem Vormarsch,<sup>233, 234</sup> meist ist für die genaue Identifikation der entsprechenden Modifikationen allerdings ein Verdau zu Nukleosiden erforderlich, wodurch jegliche Sequenzinformation verloren geht. Darüber hinaus existieren noch viele weitere Techniken zur Analyse von Ribonukleinsäuren, welche jedoch oftmals nur einen beschränkten Zugang zur epitranskriptomischen Untersuchung ermöglichen. Zu nennen wäre hier beispielsweise die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) oder das darauf oftmals folgende Northern-Blotting. Auch NMR-Analytik wird vermehrt zur Untersuchung von RNA-Modifikationen, speziell in der Strukturaufklärung eingesetzt.<sup>235</sup>

Bei vielen der zuvor erwähnten Analyse-Methoden kann eine vorherige Derivatisierung der zu untersuchenden Modifikationen hilfreich sein. Dabei steht eine Vielzahl von chemischen Reagenzien zur Verfügung, um einzelne Positionen in einem Oligonukleotid modifikations-spezifisch zu markieren. Moderne Verfahren zur Sequenzierung und in der Massenspektrometrie nutzen diese Markierungsstrategien, um RNA-Modifikationen in Nukleinsäuren effizient nachzuweisen und zu lokalisieren. Die Umsetzung von RNA mit N-cyclohexyl-N'- $\beta$ -(4-methylmorpholinium)ethylcarbodiimide-*p*-tosylat (CMCT) führt beispielsweise zu einer kovalenten Bindung, welche im Falle von  $\Psi$  irreversibel ist.<sup>236</sup> Bei folgender Sequenzierung entsteht an dieser

Stelle ein Strangbruch, wodurch die Position von  $\Psi$ -Modifikationen festgestellt werden kann. Aber auch die massenspektrometrische Analyse dieses Derivates ist möglich und wird zur Unterscheidung von U und  $\Psi$  bei Oligonukleotid-MS eingesetzt.<sup>237</sup> Für die Lokalisierung von  $m^5C$ -Positionen wird dagegen oftmals Bisulfit-Sequenzierung angewandt. Bei der Umsetzung mit Bisulfit werden zwar alle Cytidine in Uridin umgewandelt, aufgrund abweichender Elektrophilie ist  $m^5C$  von dieser Reaktion jedoch nicht betroffen. Erneut kann dies anschließend über Sequenzierung festgestellt werden. Eine weitere Methode zur Feststellung der Position von RNA-Modifikationen ist die Anreicherung der entsprechenden Oligonukleotide. Über spezifische Antikörper werden die entsprechenden Modifikationen beispielsweise gebunden und können somit angereichert werden.<sup>238</sup> Darauf folgende Massenspektrometrie oder Sequenzierung kann Aufschluss über die Position des modifizierten Oligonukleotids im Transkriptom geben. Der Nachweis von Queuosin könnte dagegen über die stärkere Retardation auf Boronat-Polyacrylamid-Gelen gegenüber unmodifizierter RNA erfolgen.<sup>239</sup> Eine Zusammenfassung aktueller chemischer Detektionsmethoden für Nukleinsäuren wurde im Zuge meiner Masterarbeit in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefanie Kellner erstellt:<sup>240</sup>

„Detection of nucleic acid modifications by chemical reagents“, **M. Heiss** und S. Kellner; *RNA Biology*, **2017**, 14(9): 1166-1174.

Autorenbeitrag: Der Review wurde von Stefanie Kellner und mir ausgearbeitet.

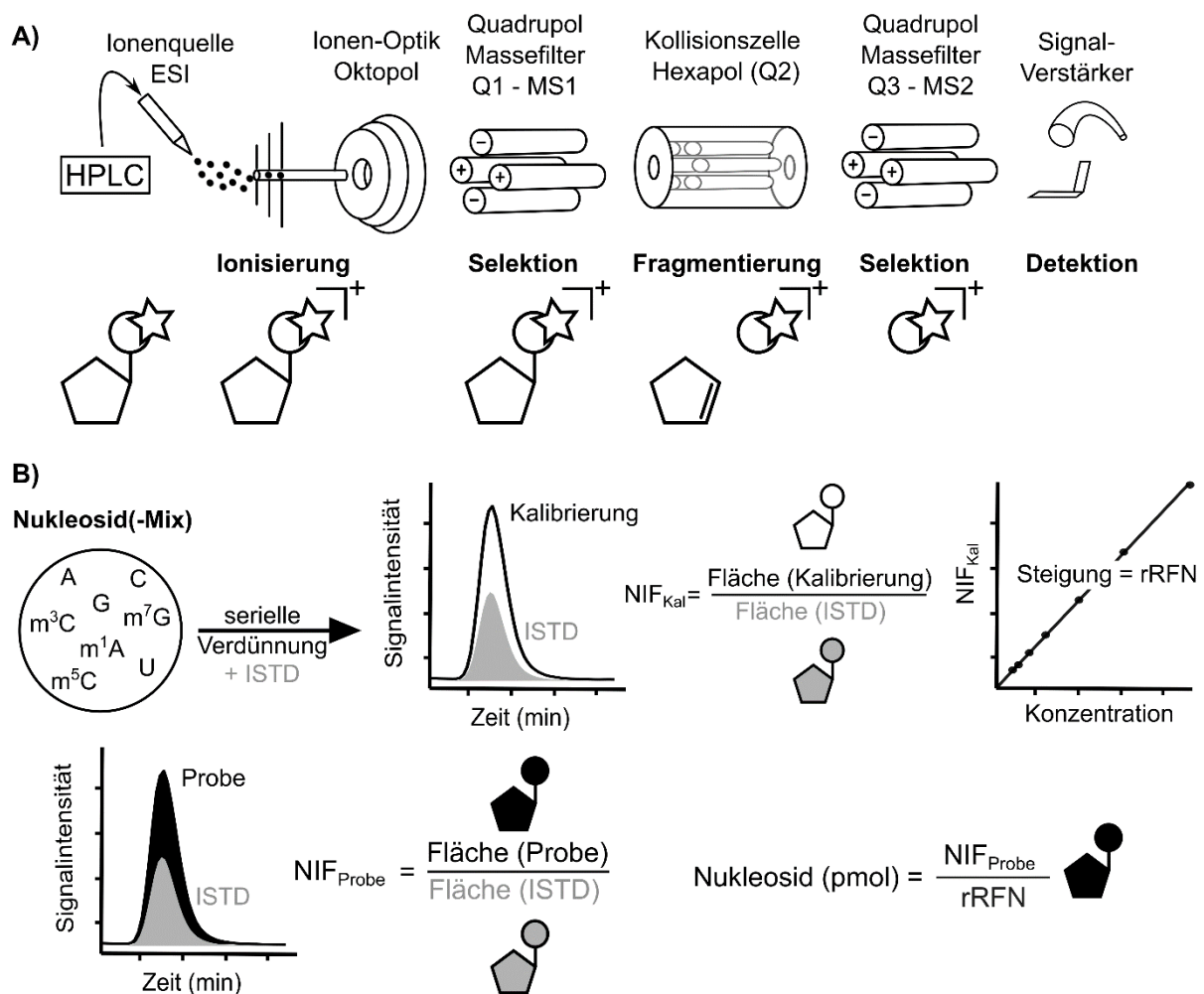
### 1.4.2 Massenspektrometrie zur Untersuchung von RNA-Modifikationen

Für die Analytik mittels Massenspektrometrie gibt es mehrere Möglichkeiten. An erster Stelle steht die Wahl einer geeigneten Ionisierungsmethode. Mit der Entwicklung von MALDI (engl.: matrix assisted laser desorption ionization)<sup>241</sup> und ESI (Elektrospray-Ionisation)<sup>242</sup> wurden die Möglichkeiten der Nukleinsäure-Analytik durch geeignete Ionenquellen stark ausgeweitet. MALDI bietet dabei den Vorteil, dass Oligonukleotide leicht ionisiert werden können.<sup>243, 244</sup> Die entstehenden Ionen tragen jedoch meist nur eine Ladung, wodurch diese vergleichsweise instabil sind.<sup>245, 246</sup> Eine ESI-Quelle bietet dagegen den Vorteil, dass sie – im Gegensatz zu MALDI – problemlos mit vorgeschalteter Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt werden kann.<sup>247, 248</sup> Dies ermöglicht die Trennung verschiedener Substanzen vor der Analytik und vereinfacht somit die Auswertung der entstehenden Spektren. Zudem ist die Ionisierung über ESI besonders schonend und kann durch die Elektronik einfach an die Analyten angepasst werden.

Aber auch bei den verschiedenen Detektionsverfahren gibt es weitreichende Unterschiede. Für hochauflösende Massenspektrometer wird meist ein TOF-Detektor (engl.: time of flight) oder eine Orbitrap verwendet. Die höchste Sensitivität kann dagegen durch ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (QQQ) erreicht werden. Nach der Ionisierung in der Quelle werden die Ionen hierfür über einen ersten Quadrupol anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) gefiltert. Nach Selektion der sogenannten Vorläufer-Ionen werden diese in die Kollisionszelle weitergeleitet, in der über Kollision mit einem inerten Gas (oftmals Stickstoff) Produkt-Ionen freigesetzt werden (CID, engl.: collision induced dissociation). Bis auf wenige Ausnahmen (bspw.  $\Psi$ ) wird in der Nukleosid-Analytik über diesen Massenübergang somit die geladene Nukleobase erhalten. Diese wird durch Einstellung des entsprechenden  $m/z$ -Verhältnisses über einen zweiten Quadrupol erneut gefiltert und somit zum Detektor weitergeleitet. Dort löst das ankommende Ion über einen Signalverstärker eine Kettenreaktion aus und wird dann in Form einzelner freigesetzter Elektronen nachgewiesen. Dieser Messmodus nennt sich (D)MRM, (engl.: (dynamic) multiple reaction monitoring). In Sekundenbruchteilen kann die Elektronik der einzelnen Bauteile so verändert werden, dass in einer einzigen Sekunde über 50 verschiedene Massenübergänge detektiert werden können. Durch die gezielte Auswahl einzelner Ionen werden Hintergrundsignale so weit wie möglich eliminiert und somit eine hohe Sensitivität erreicht. Der generelle Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers ist in **Abbildung 1.13 A** gezeigt.

Die zuvor beschriebene Methode ist insbesondere für die quantitative Bestimmung von kleineren Molekülen (hier: Nukleosiden) geeignet. In Kombination mit einer vorgeschalteten HPLC und einer ESI-Quelle ist somit bei hoher Sensitivität die simultane Quantifizierung mehrerer Nukleoside gleichzeitig möglich.<sup>249, 250</sup> Ein QQQ-Massenspektrometer stellt in der Regel jedoch mehrere verschiedene Modi zur Verfügung. So können beispielsweise alle Ionen detektiert werden, welche ein Neutralteilchen zuvor bestimmter Masse verlieren. Dies ist oftmals bei Nukleosiden der Fall, da in der Kollisionszelle die Ribose abgespaltet wird. Über diese Methode gelang in der Vergangenheit bereits die Entdeckung einiger neuer Modifikationen.<sup>251, 252</sup> Ein weiterer Modus wäre die Erstellung eines sogenannten MS2-Scans, bei dem lediglich der zweite Quadrupol in Sekundenbruchteilen zwischen den Filtereigenschaften wechselt. So wird die Aufzeichnung eines Spektrums in festgelegtem  $m/z$ -Bereich ermöglicht. Darüber hinaus existieren weitere Möglichkeiten, auf welche hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Generell zu beachten ist, dass Massenspektrometrie an sich keine quantitative Methodik ist. Dennoch ist eine Quantifizierung über interne Standards und die Erstellung einer Kalibriergerade möglich.<sup>253</sup> Verdünnungen eines Nukleosids werden mit gleichbleibender Menge eines internen Standards gemischt und anschließend gemessen. Daraus kann eine Kalibriergerade erstellt werden.<sup>254</sup> Den Proben wird die gleiche Menge an internem Standard zugegeben, wodurch die Menge an Nukleosid in der jeweiligen Probe über die Kalibriergerade bestimmt werden kann. (**Abbildung 1.13 B**). Der interne Standard soll dabei sicherstellen, dass Effekte wie Ionensuppression oder abweichende Ionisierungseigenschaften keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben und ist daher im besten Fall ein Isotopolog des zu analysierenden Nukleosids.



**Abbildung 1.13: Allgemeine Funktionsweise eines LC-MS/MS-Systems. (A)** Aufbau eines LC-MS/MS Systems und Fragmentierung von Nukleosiden. **(B)** Quantifizierung von Nukleosiden über Massenspektrometrie mithilfe von internen Standards (ISTD). NIF = Nukleosid-Isotopen Faktor, rRFN = relativer Signal-Faktor für Nukleoside.

### 1.4.3 Isotopenmarkierung als Hilfsmittel in der Wissenschaft

Besonders hilfreich in der Entdeckung von neuen RNA-Modifikationen und deren molekularen Mechanismen über Massenspektrometrie ist dabei die Markierung der entsprechenden RNA-Moleküle mit stabilen Isotopen. Die Anwendung von Isotopenmarkierung zur Aufklärung molekularer Vorgänge ist keine neue Erfindung. Bereits Melvin Calvin verwendete Isotopenmarkierung um die Mechanismen des nach ihm benannten Calvin-Zyklus nachzuvollziehen,<sup>255</sup> und auch das Meselson-Stahl-Experiment, welches die semikonservative Replikation der DNA belegte, wurde durch den Einsatz von Isotopen ermöglicht.<sup>256</sup> Die Markierung von Proteinen in Zellkultur mithilfe von isotopenmarkiertem Medium (SILAC)<sup>257, 258</sup> zählt heute zu Standardverfahren in der Proteinanalytik und wurde durch die Bereitstellung geeigneter Medien bereits kommerzialisiert. Ebenso kommt isotopenmarkierte RNA bei der Untersuchung von RNA-Strukturen und deren Dynamik über Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) zum Einsatz.<sup>259</sup> Aber auch in der Epigenetik und der Epitranskriptomik findet das Konzept der Isotopenmarkierung immer mehr Anwendungen. Durch entsprechende Experimente konnte so beispielsweise die Dynamik und Funktion der oxidierten Modifikationen von m<sup>5</sup>C in DNA von Maus-Stammzellen verfolgt werden.<sup>260, 261</sup>

Isotopenmarkierung von RNA *in vivo* eröffnet ein weitreichendes Feld an analytischen Methoden für RNA-Modifikationen. Gerade bei der Entdeckung neuer Modifikationen wurden über entsprechende Markierungs-Experimente in den letzten Jahren große Erfolge erzielt. So wurde im Mausmodell über die Zugabe von D<sub>3</sub>-Methionin – welches anschließend als Methylgruppen-Donor für RNA-Modifikationen dient – die Modifikation 5-Hydroxymethyl-2'-O-methylcytidin (hm<sup>5</sup>Cm) entdeckt.<sup>262</sup> Über hochauflösende Massenspektrometrie und die Fragmentierung der unbekannten Modifikation konnten Rückschlüsse auf die Summenformel gezogen werden. Zudem konnte die Dynamik der Modifikationen 5-Hydroxymethylcytidin (hm<sup>5</sup>C) und 5-Formylcytidin (f<sup>5</sup>C) untersucht werden.<sup>188</sup> Chemisch synthetisierte, isotopenmarkierte Varianten der entsprechenden Modifikationen dienten als interne Standards (ISTD) zur Bestätigung der angenommenen Struktur. Für die Untersuchung von Oligonukleotiden wurde die sogenannte CARD<sup>263</sup> bzw. SIL-CARD<sup>264</sup> (engl.: **S**table **I**sotope **L**abeling **C**omparative **A**nalysis of **R**NA **D**igests) Technik entwickelt, welche ebenso auf Isotopenmarkierung von RNA-Molekülen beruht und die gezielte Analyse von Veränderungen im Modifikationsprofil von Oligonukleotiden ermöglicht.

In Bakterien reichen die Möglichkeiten besonders weit: Durch die Zugabe einfacher, isotopenmarkierter Salze oder anderer kleiner Metaboliten (bspw. Glukose) zum Kulturmedium ist eine

vollständige Isotopenmarkierung der RNA möglich. Somit ist die Markierung durch  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - oder  $^{34}\text{S}$ -Atome möglich. Durch Masseunterschiede einzelner Signale aus den jeweiligen Kulturen konnte auf die Summenformel einer bis dahin unbekannten Modifikation geschlossen werden, wodurch die Entdeckung von 2-Methylthiomethylenethio-N6-isopentenyl-adenosin (msms $^{2i6}\text{A}$ ) gelang.<sup>265</sup> Über eine vergleichbare Methode und die Anwendung eines Neutralteilchen-Verlust-Scans (NLS, engl.: Neutral Loss Scan) über Tandem-Massenspektrometrie konnten Summenformeln für 10 weiteren Signale ermittelt werden, welche keiner, bis dahin bekannten Modifikation zugewiesen werden konnten.<sup>252</sup> Eine Bestimmung der Summenformel wäre ohne die Anwendung von Isotopenmarkierung nur über hochauflösende Massenspektrometrie möglich, dort ergibt sich aber das Problem weitaus geringerer Sensitivität gegenüber Tandem-Massenspektrometrie.

Besonders praktisch ist die biosynthetische Herstellung eines isotopenmarkierten internen Standards, welcher als SILIS (engl.: **S**table **I**sotope **L**abeled **I**nternal **S**tandard) bezeichnet wird. Die Herstellung wäre zwar auch auf synthetischem Wege möglich,<sup>266</sup> ist aufgrund der hohen Diversität an RNA-Modifikationen aber kaum für alle durchführbar. Durch Isotopenmarkierung *in vivo* wird die Herstellung eines SILIS, und somit die absolute Quantifizierung aller im Organismus anwesenden Modifikationen über Massenspektrometrie ermöglicht.<sup>267</sup> Die Retentionszeiten der aus dem SILIS stammenden Isotopologe stimmen aufgrund der gleichbleibenden physikochemischen Eigenschaften mit den Retentionszeiten der nicht isotopenmarkierten Nukleoside aus der Probe überein. Somit können Einflüsse wie Ionensuppression oder strukturabhängige Ionisierungseigenschaften ausgeglichen werden. Ohne die Verwendung des entsprechenden SILIS ist nur eine relative Quantifizierung und damit lediglich ein Vergleich von einzelnen Proben untereinander möglich.<sup>268</sup> Bei gleichzeitiger Isotopenmarkierung der eigentlichen Proben ist ein Masseunterschied zwischen den SILIS-Isotopologen und den Proben-Isotopologen von mindestens 2 Dalton anzustreben, um fehlerhafte Quantifizierungen aufgrund des natürlich auftretenden  $^{13}\text{C}$ -Atoms auszuschließen.

Da Isotopenmarkierung von RNA-Molekülen vielerlei Vorteile aufweist, spezialisierte sich unser Labor um Prof. Dr. Stefanie Kellner schon früh auf die Etablierung und Anwendung von verschiedenen Markierungs-Techniken in diversen Modellorganismen. So konnten wir schon früh das Akronym „NAIL-MS“ einführen, welches für Isotopenmarkierung von Nukleinsäuren gekoppelt mit Massenspektrometrie steht (engl.: **N**ucleic **A**cid **I**sotope **L**abeling coupled **M**ass **S**pectrometry). Über NAIL-MS eröffnen sich dabei mehrere Möglichkeiten einen tieferen Einblick in die Welt der RNA-Modifikationen zu gewinnen (**Abbildung 1.14**). Die Entdeckung



## 1.4 Detektionsverfahren für RNA-Modifikationen

neuer Modifikationen, wie sie zuvor bereits zum Teil Anwendung fand, ist nur eine davon. Weitere Möglichkeiten sind das Verfolgen von Modifikationsdynamiken, oder vergleichende/komparative Studien, ähnlich zu den in der Proteomik im Kontext von SILAC durchgeführten Experimenten. Darüber hinaus wird die biosynthetische Herstellung von internen Standards in Form von SILIS in mehreren Modellorganismen ermöglicht. Die Vorteile der Anwendung von NAIL-MS<sup>269, 270</sup> konnten ebenso wie erste Erfolge bereits in mehreren Publikationen veröffentlicht werden, welche zum Teil auch Inhalt der vorliegenden Dissertation sind. So gelang die Entdeckung von 2-Methylthiocytidin ( $\text{ms}^2\text{C}$ ),<sup>251</sup> sowie die Aufklärung der Modifikationsdynamik nach MMS-Schäden in Bakterien.<sup>271, 272</sup> In meiner Masterarbeit war es mir zudem bereits möglich, NAIL-MS erfolgreich auf die Untersuchung von tRNA-Modifikationsdynamiken in *S. cerevisiae* anzuwenden:<sup>273</sup>

„Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS“, **M. Heiss**, VF. Reichle, S. Kellner; *RNA Biology*, **2017**, 14(9): 1260–1268.

Autorenbeitrag: Alle *in vivo* Experimente, die RNA Isolation und Aufreinigung von RNA, die Quantifizierung über LC-MS/MS, sowie HRMS Messungen wurden von mir geplant und durchgeführt. Valentin Reichle half bei der Durchführung einzelner „Pulse-Chase“-Experimente. Stefanie Kellner half mir bei der Planung der Experimente. Die Ausarbeitung des Manuskripts erfolgte durch enge Zusammenarbeit von Stefanie Kellner, Valentin Reichle und mir.



**Abbildung 1.14: Anwendungsgebiete von NAIL-MS.**



## 2. Ziel der Arbeit

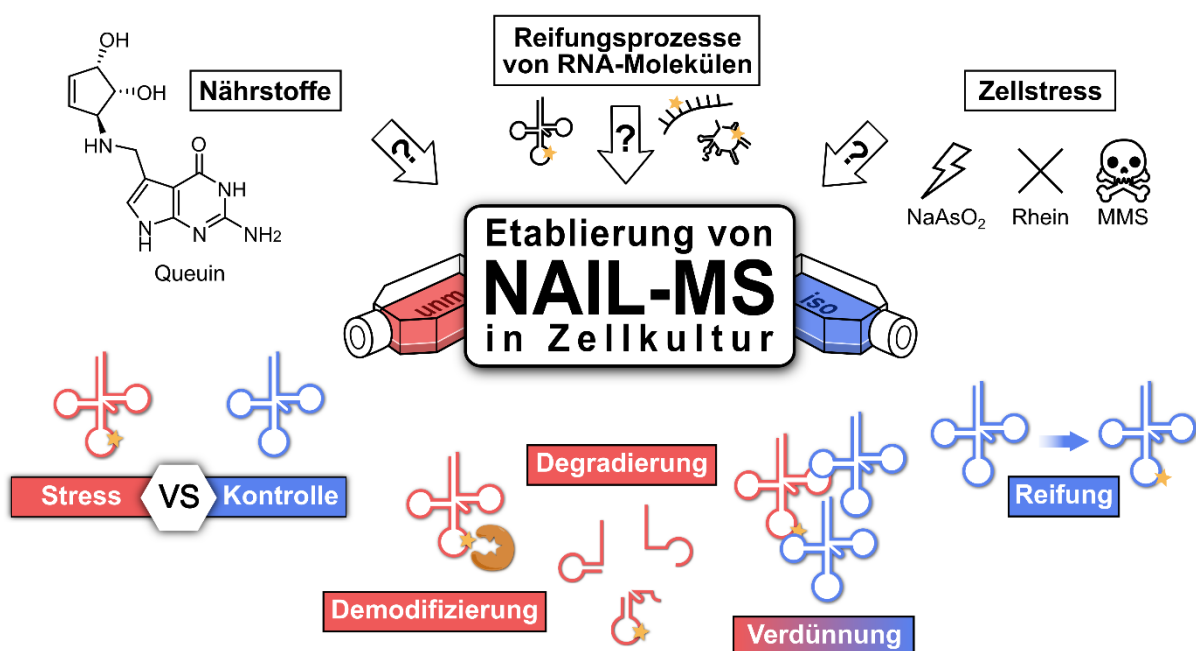
Massenspektrometrische Analysen tragen maßgeblich zur Untersuchung der molekularen Ursachen und Auswirkungen von RNA-Modifikationen bei. Eine Einschränkung dabei ist allerdings, dass größtenteils statische Level analysiert werden und der Aspekt der Modifikationsdynamik somit meist vernachlässigt wird. Da vermehrt Korrelationen zwischen RNA-Modifikationen und vielen Krebsarten und neurologischen Krankheiten berichtet wurden, trägt das genaue Verständnis ebendieser Dynamik grundlegend zum Fortschritt der Diagnostik und Behandlung dieser Erkrankungen bei. Durch die Untersuchung von RNA-Modifikationsdynamiken in humanen Zellen könnte mehr Einsicht in molekulare Mechanismen gewonnen werden und somit der Fortschritt in Forschung & Medizin vorangetrieben werden. Eine Technik, welche instande ist, einige der Schwächen von Massenspektrometrie zu kompensieren, ist NAIL-MS (Nucleic Acid Isotope Labeling coupled Mass Spectrometry). Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen und somit über Markierung von RNA-Molekülen mit stabilen Isotopen einen vertieften Einblick in die Funktionen von RNA-Modifikationen und speziell deren Dynamik zu gewinnen.

Für geeignete Isotopenmarkierung in Zellkultur ist die Wahl der Isotopologe, welche in Form von RNA-Nukleosiden inkorporiert werden sollen, essenziell. Aufgrund der Komplexität von Zellkulturmedien wurde eine weitreichende Unterdrückung der *de novo* Nukleotid-Biosynthese angestrebt. Über diverse Validierungs-Experimente sollte zusätzlich die Integrität von NAIL-MS sichergestellt werden. NAIL-MS sollte schließlich auf die Untersuchung der Prozessierung neuer und bereits existierender RNA-Moleküle angewandt werden, indem durch einen entsprechenden Mediumwechsel der Einbau von Modifikationen in neu entstehende RNA-Moleküle zeitaufgelöst verfolgt werden kann. Gleichzeitig ist die Aufklärung molekularer Prozesse in bereits existierenden RNA-Molekülen möglich. So kann die molekulare Ursache von Änderungen im Modifikationsprofil durch NAIL-MS festgestellt werden. Sowohl die Verdünnung durch neu entstehende, unmodifizierte RNA-Moleküle, als auch die zielgerichtete Degradation modifizierter RNA-Moleküle würde zu einem Absinken der Modifikationsdichte führen. Eine aktive Demodifizierung durch eine der momentan heiß debattierten Demethylasen stellt eine weitere Möglichkeit dar das Modifikationslevel zu senken. Durch die Anwendung von NAIL-MS soll aufgeklärt werden, wie diese molekularen Mechanismen zu einer Änderung im Modifikationsprofil beitragen.

## 1.4 Detektionsverfahren für RNA-Modifikationen

Konkret sollten diese Mechanismen in 28S rRNA, 18S rRNA und einigen ausgewähltem tRNA-Isoakzeptoren untersucht werden. Im Zuge der Etablierung von NAIL-MS wurden Zellen diversen Stressfaktoren ausgesetzt, und anschließend die Unterschiede im Modifikationsprofil bestimmt. Stressexperimente wurden mit Rhein und MMS, und außerhalb der NAIL-MS Analytik mit NaAsO<sub>2</sub> durchgeführt. Zudem sollte der Effekt von Queuin-Supplementierung auf die entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren und deren Modifikationsprofil untersucht werden. Da Queuin von Eukaryoten nicht synthetisiert werden kann, ist der Einbau der Queuosin-Modifikation von der externen Supplementierung abhängig. Dies könnte zu Veränderungen des Modifikationsprofils der Queuin-abhängigen tRNA-Isoakzeptoren führen. **Abbildung 2.1** gibt einen Überblick zu den einzelnen Projekten und zeigt auf, wie durch die Anwendung von NAIL-MS eine Differenzierung verschiedener molekularer Mechanismen vorgenommen werden soll.

Letztendlich soll NAIL-MS in Zellkulturen dazu beitragen, die Mechanismen hinter RNA-Modifikationen und deren Dynamik aufzuklären, und so eine bessere Einsicht in die molekularen Ursachen und Symptome von Krankheiten wie Krebs und neurologischen Störungen zu erhalten.



**Abbildung 2.1: Zielsetzungen der Arbeit.** Die Etablierung von NAIL-MS in Zellkultur steht im Mittelpunkt der Arbeit. Mithilfe von NAIL-MS soll die Auswirkung vom Nährstoffangebot und von Zellstress auf die Modifikationsdynamik und die allgemeinen Reifungsprozesse von RNA-Molekülen untersucht werden. NAIL-MS ermöglicht dabei die Diskriminierung verschiedener Adaptionsmechanismen. Rot = Medium 1, hier unmarkiert (unm); blau = Medium 2, hier isotopenmarkiert (iso); gelbe Sterne = Modifikationen

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen

#### Gemeinsamer Prolog

In den letzten Jahren rückte die Relevanz von RNA-Modifikationsdynamik immer weiter in den Fokus der Wissenschaft. Dies kann größtenteils darauf zurückgeführt werden, dass zuletzt vermehrt Korrelationen zwischen den chemischen Modifikationen der kanonischen Nukleoside Cytidin, Uridin, Guanosin und Adenosin und vieler neurologischer Krankheiten berichtet wurden.<sup>207</sup> Problematisch hierbei ist, dass mit herkömmlichen Methoden, wie Sequenzierung oder Massenspektrometrie oftmals nur statische Level analysiert werden, und nicht näher auf die Dynamik *in vivo* eingegangen wird. NAIL-MS (kurz für engl.: nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry) adressiert dieses Problem, indem Nukleoside in Zellen durch Zugabe von stabilen Isotopen markiert werden. Diese können anschließend durch Massenspektrometrie aufgrund abweichender Molekülmassen, von unmarkierten Nukleosiden unterschieden werden. Nach der bereits erfolgreichen Etablierung von NAIL-MS in *S. cerevisiae* während meiner Masterarbeit (siehe weitere Publikationen), war es mein Ziel, diese Methodik auch für humane Zellen zu implementieren. Während die Einführung von stabilen Isotopen in RNA von Bakterien und Hefen vergleichsweise unkompliziert ist, gestaltete sich dies aufgrund der höheren Komplexität des Mediums in Zellkultur als schwierig. Die Supplementierung mehrerer einfacher Metaboliten, wie  $^{15}\text{N}$ -Glutamin oder  $^{13}\text{C}_6$ -Glukose führte nicht zu einheitlicher Markierung der Nukleoside. Die gewünschte Isotopenmarkierung konnte durch die Zugabe von  $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Uridin und  $^{15}\text{N}_5$ -Adenin erreicht werden. Kombiniert mit der Zufütterung von  $\text{D}_3$ -Methionin, konnten RNA-Reifungsprozesse am Beispiel von 18S rRNA und  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{GAA}}$  aufgeklärt werden. Des Weiteren wurde die molekulare Reaktion der Zellen auf Methylierungs-Stress durch Methylmethansulfonat (MMS) näher beleuchtet (*Nat. Comm.*, **2021**). Die gesamte Methodik von NAIL-MS, inklusive RNA-Isolation und -Aufreinigung, wurde in einer weiteren Publikation für verschiedene Modellorganismen zusammengefasst (*Methods*, **2019**), und die detaillierten Einzelschritte zusätzlich in einem Buchkapitel beschrieben (*Methods in Mol. Biol.*, **2021**). Ergänzende Studien zu Effekten der Isotopenmarkierung, sowie Kinetiken des Auf- und Abbaus und die Prozessierung von RNA-Molekülen werden im folgenden Abschnitt behandelt.

“Cell culture NAIL-MS allows insight into human tRNA and rRNA modification dynamics *in vivo*”, **M. Heiss**, F. Hagelskamp, V. Marchand, Y. Motorin, S. Kellner; *Nat. Comm.*, **2021**, 12 (1): 389.

Autorenbeitrag: Alle *in vivo* Experimente, die RNA-Isolation und -Aufreinigung von RNA, die Quantifizierung über LC-MS/MS, sowie HRMS-Messungen wurden von mir geplant und durchgeführt. Bei der Etablierung der Isotopenmarkierung (insbesondere für HeLa Zellen) half Felix Hagelskamp. Sequenzierungs-Daten wurden von Virginie Marchand und Yuri Motorin bereitgestellt. Die Ausarbeitung des Manuskripts erfolgte durch Stefanie Kellner, Felix Hagelskamp und mich.

Kopie des Artikels mit Erlaubnis des Verlages: <https://www.nature.com/ncomms/>

„Surpassing limits of static RNA modification analysis with dynamic NAIL-MS“, V. F. Reichle, S. Kaiser, **M. Heiss**, F. Hagelskamp, K. Borland, S. Kellner; *Methods (San Diego, Calif.)*, **2019**, 156: 91–101.

Autorenbeitrag: Alle *in vivo* Experimente in Zellkultur und Hefe wurden von mir geplant, durchgeführt und etabliert. Weitere Ergebnisse wurden von den anderen AutorInnen bereitgestellt. Die Ausarbeitung des Manuskripts erfolgte durch intensive Zusammenarbeit aller AutorInnen.

Kopie des Artikels mit Erlaubnis des Verlages: <https://www.journals.elsevier.com/methods>

„Quantification of modified nucleosides in the context of NAIL-MS“, **M. Heiss**, K. Borland, Y. Yoluç, S. Kellner; *Methods in Mol. Biol.*, **2021**, RNA Modifications (18)

Autorenbeitrag: Die beschriebenen Zellkulturmethoden wurden von mir entwickelt. Alle weiteren beschriebenen Methoden wurden über die Jahre hinweg von allen AutorInnen, sowie weiteren Labormitgliedern etabliert und optimiert. Die Ausarbeitung des Manuskripts erfolgte durch intensive Zusammenarbeit aller AutorInnen

Kopie des Artikels mit Erlaubnis des Verlages: <https://www.springer.com/series/7651>

ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20576-4>

OPEN

# Cell culture NAIL-MS allows insight into human tRNA and rRNA modification dynamics in vivo

Matthias Heiss<sup>1</sup>, Felix Hagelskamp<sup>1</sup>, Virginie Marchand <sup>2</sup>, Yuri Motorin<sup>2</sup> & Stefanie Kellner <sup>1,3</sup>✉

Recently, studies about RNA modification dynamics in human RNAs are among the most controversially discussed. As a main reason, we identified the unavailability of a technique which allows the investigation of the temporal processing of RNA transcripts. Here, we present nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry (NAIL-MS) for efficient, monoisotopic stable isotope labeling in both RNA and DNA in standard cell culture. We design pulse chase experiments and study the temporal placement of modified nucleosides in tRNA<sup>Phe</sup> and 18S rRNA. In existing RNAs, we observe a time-dependent constant loss of modified nucleosides which is masked by post-transcriptional methylation mechanisms and thus undetectable without NAIL-MS. During alkylation stress, NAIL-MS reveals an adaptation of tRNA modifications in new transcripts but not existing ones. Overall, we present a fast and reliable stable isotope labeling strategy which allows in-depth study of RNA modification dynamics in human cell culture.

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich, Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany. <sup>2</sup>Université de Lorraine, CNRS, Inserm, UMS2008/US40 IBSLor and UMR7365 IMoPA, F-54000 Nancy, France. <sup>3</sup>Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Str, 9, 60438 Frankfurt, Germany. ✉email: [stefanie.kellner@cup.uni-muenchen.de](mailto:stefanie.kellner@cup.uni-muenchen.de)

Most RNAs studied to date were found to be covalently modified by dedicated enzymes in a site-specific manner. In addition to the placement of RNA modifications by RNA writer enzymes, their direct removal through e.g., demethylation by RNA erasers was reported. In human cells, the  $\alpha$ -ketoglutarate dependent dioxygenases ALKBH5 and/or FTO were found to catalyze the demethylation of e.g., (2'-O-methyl-) N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A(m)) in mRNA<sup>1,2</sup> and thus influence, e.g., the stability and translational function of mRNA<sup>1,3–8</sup>.

For human tRNAs, a similar relationship of RNA writers and erasers was observed. E.g., ALKBH1 demethylates 1-methyladenosine (m<sup>1</sup>A) and appears to be responsive to glucose starvation in some cell lines<sup>9</sup>. Considering the half-life of mammalian tRNAs (~100 h<sup>10</sup>), a fast adaptation by removal of modified residues appears beneficial to react to changes in the cellular environment<sup>11</sup>. Unfortunately, it is currently not possible to analyze the speed of both modification and demethylation reactions inside human cells. Thus, it is not possible to study the impact of external stimuli and stress on human RNA modification kinetics and processing of mature RNA.

tRNA is the most extensive and chemically diverse modified RNA with ~10–15% of all nucleosides being modified<sup>12</sup>. Recent studies showed that certain modified nucleosides in specific tRNAs are only partially modified<sup>13,14</sup> and that tRNA modification abundance differs among tissues<sup>15,16</sup>. This would allow for an adaptation of translation by tRNA modification as recently suggested<sup>17</sup>. While the speed of tRNA amino acid charging<sup>18</sup> and tRNA transcription and half-life are known<sup>10</sup>, the speed of modification processes is difficult to study. For example, tRNA<sup>Phe</sup> is heavily post-transcriptionally modified and in addition one of the best studied RNAs<sup>19–21</sup>. By using stable isotope labeled tRNA<sup>Phe</sup> substrate and cellular extracts, the modification dynamics and hierarchy was recently solved in *S. cerevisiae* using NMR spectroscopy<sup>22</sup>. Under the influence of chemical stress, *S. cerevisiae* was reported to adapt its abundance of tRNA modifications and thus influence its translation and the term stress induced tRNA reprogramming was coined<sup>11,23</sup>. Similar evidence has been observed in other organisms, including mammals<sup>24</sup>. In this context, the question remains by which mechanism and how fast tRNA modifications respond to external stimuli.

In contrast to tRNA, 18S rRNA is mainly modified by methylation of ribose and altogether only 2.05% nucleosides are modified. While tRNA modifications are easily accessible for potential RNA erasers, rRNA modifications are placed in the functional regions of the ribosome<sup>25</sup>. Although modified sites in rRNA have been reported to regulate translation initiation by promoting the recognition of different mRNA subsets<sup>26</sup>, their inaccessibility in mature ribosomes makes them a difficult target for RNA erasers.

Current studies of RNA modifications are limited to either mass spectrometric analysis<sup>16</sup> or sequencing<sup>27,28</sup>. Both techniques provide information on the modification status at the time point of sample harvest and give no details on the mechanisms of RNA modification adaptation. To overcome this limitation, we have recently developed NAIL-MS (nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry) in bacteria<sup>29,30</sup> and yeast<sup>31</sup>, which reveals the dynamics of RNA modification processes. The technique is based on metabolic stable isotope labeling of RNA using simple nutrients with e.g., carbon-13, nitrogen-15, or sulfur-34. By combining differentially labeled media in a pulse chase set-up, we recently succeeded to observe tRNA demethylation through AlkB in *E. coli* in vivo. Currently, NAIL-MS studies are not available for human cell lines as a monoisotopic labeling of all four canonical nucleosides is highly complex.

Here, we report a fast and reliable method for monoisotopic stable isotope labeling in both RNA and DNA (>95% within

7 days) in common human cell lines and growth media. We apply the cell culture NAIL-MS method and reveal the dynamics of human tRNA and 18S rRNA modifications in depths unreachable by any other tool for RNA modification analysis. Furthermore, we resolve the mechanism of stress induced tRNA modification reprogramming in the presence of methylation stress. With cell culture NAIL-MS it is finally possible to study the speed of both modification and demethylation reactions inside human cells. Thus, it will be possible to study the impact of external stimuli and stress on human RNA modification kinetics and processing of mature RNA.

## Results

### Absolute quantification of human tRNA<sup>Phe</sup> modifications.

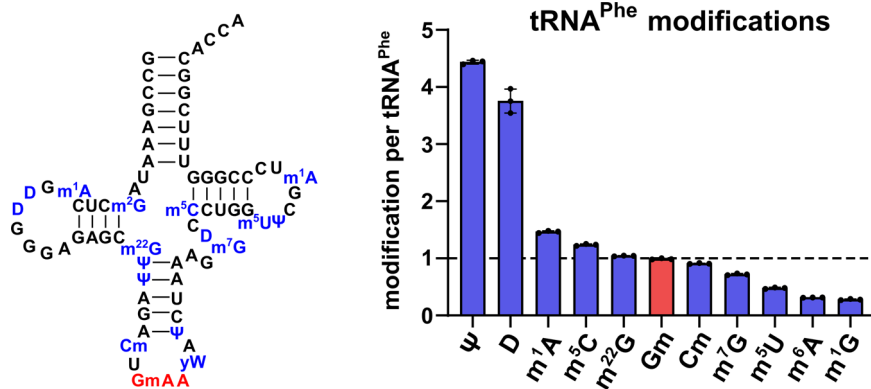
tRNA<sup>Phe</sup> is heavily post-transcriptionally modified and in addition one of the best studied RNAs<sup>19–22</sup>. Thus, it is an ideal model to study the temporal dynamics of its modifications. In a first step, we purified tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> from HEK 293 cells using a complementary DNA probe<sup>13</sup>. We used our established isotope dilution LC-MS/MS analysis for absolute quantification of modified nucleosides and plotted the modification profile in Fig. 1<sup>16</sup>. For pseudouridine (Ψ), dihydrouridine (D), 2,2-dimethylguanosine (m<sup>2</sup><sub>2</sub>G), and 2'-O-methylguanosine (Gm) our experimental data matches the expected values and we see full modification<sup>32</sup>. The abundance of 1-methyladenosine (m<sup>1</sup>A position 14 and 58), 7-methylguanosine (m<sup>7</sup>G), 5-methyluridine (m<sup>5</sup>U or rT), and 2'-O-methylcytidine (Cm) is lower compared to the literature, presumably due to partial modification of the respective sites. Partial modification has been suggested to play a role in stress induced reprogramming of tRNA modifications<sup>17</sup>. The abundance of 5-methylcytidine (m<sup>5</sup>C) is slightly higher than expected and can be explained by the additional methylation of C48 by NSUN2<sup>33</sup>.

Although 1-methylguanosine (m<sup>1</sup>G) is not reported in tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub>, we found around 0.3 m<sup>1</sup>G per tRNA. This observation can be explained by the fact that m<sup>1</sup>G is a precursor during the biosynthesis of wybutosine (yW), a hypermodified nucleoside reported at position 37 of tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub><sup>34,35</sup>. Due to the unavailability of a synthetic standard, yW could not be quantified in this study. In addition, we also quantified the abundance of other modified nucleosides (Table S1). We found around 0.3 6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) per tRNA, potentially caused by intracellular Dimroth rearrangement of m<sup>1</sup>A<sup>36</sup>. In addition, we found 0.063 inosine (I) and 0.026 1-methylinosine (m<sup>1</sup>I) per tRNA<sup>Phe</sup>. These are most likely artefacts from spontaneous A and m<sup>1</sup>A deamination. All other modified nucleosides were found with an abundance of less than 1.6% (e.g., 0.016 N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenosine (t<sup>6</sup>A) per tRNA) which indicates a high purity of isolated tRNA<sup>Phe</sup>. Northern Blot analysis and deep sequencing of purified tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> sample indicated that this tRNA represents >90% with only minor contaminations by other tRNAs and rRNA (Figs. S1a and S2).

Overall, the detected quantities of modified nucleosides from purified tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> are in accordance with the reported values and thus it is a suitable model to study the temporal placement of modified nucleosides.

**Stable isotope labeling of RNA in human cell culture.** For this purpose, a method is needed which allows the discrimination of mature RNA from new transcripts. NAIL-MS (nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry) relies on the metabolic incorporation of stable isotope labeled nutrients into RNA and allows the distinction of original RNA and new RNA within a pulse chase experiment. With this tool, we studied the temporal placement of modified nucleosides in *S. cerevisiae* total tRNA<sup>31</sup>





**Fig. 1 Absolute quantification of human tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> modifications.** The tRNA cloverleaf on the left shows the expected sequence of human tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> including reported modifications<sup>32</sup>. Right: Absolute quantification of purified tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> from HEK 293 cells done by LC-MS/MS. All experiments are from  $n = 3$  biol. replicates. Bars reflect the mean and error bars reflect standard deviation.

and the demethylation during tRNA repair in *E. coli*<sup>37</sup>. Both organisms are rather simple and can be grown in minimal media with controlled availability of stable isotope labeled nutrients.

In contrast, human cell culture medium is highly complex and requires the addition of fetal bovine serum (FBS). FBS is a natural product of undefined composition and variable concentration of metabolites. Thus, a complete and monoisotopic labeling of nucleosides and even nucleobases for a pulse chase NAIL-MS assay is challenging.

From our experience, the target isotopologue of a nucleoside must be at least 3 u heavier compared to the naturally occurring nucleoside to avoid false positive results by the detection of the natural carbon-13 signals.

De novo synthesis of nucleosides utilizes several amino acids such as glutamine or aspartic acid (Fig. S3A, B)<sup>38</sup>. Hence, we supplemented the growth media with stable isotope labeled glutamine. After 5 days (2 passages), we observed the expected stable isotope labeling of RNA (Fig. S3C). Cytidine, guanosine and adenosine got a mass increase of +2 whereas uridine just increased by +1. Due to the overlap with naturally occurring (<sup>13</sup>C)-isotopologues, this mass increase was not sufficient for our planned experiments.

As recently described, it is possible to use glucose-free growth medium and supplement with  $^{13}\text{C}_6$ -glucose<sup>37</sup>. The feeding with  $^{13}\text{C}_6$ -glucose leads to the formation of nucleosides with a variable number of  $^{13}\text{C}$ -atoms per nucleoside (Fig. S3C). During method development, we utilized the non-monoisotopic nature of  $^{13}\text{C}_6$ -glucose labeling to test the incorporation efficiency of various unlabeled metabolites. Addition of aspartate and pyruvate did not allow the envisioned monoisotopic labeling (Fig. S4). The addition of the nucleobases adenine and uracil resulted in ribose labeled purines but undefined labeled pyrimidines. This indicates a direct usage of adenine from the medium which is then enzymatically connected with  $^{13}\text{C}_5$ -ribose followed by further processing to guanosine and the respective triphosphates (Fig. S3B). RNA supplemented with the nucleosides adenosine and uridine showed undefined labeled purines and only unlabeled pyrimidines (Fig. S5). This indicates that uridine is taken up by the cells and immediately utilized for cytidine and RNA synthesis (Fig. S3A). In summary, our data indicates that the addition of adenine and uridine blocks de novo purine and pyrimidine synthesis (Fig. S3A, B) and  $^{13}\text{C}_6$ -glucose medium is not necessary for our labeling strategy (Fig. S5). Concentration optimization of both compounds revealed that final concentrations of 0.1 mM adenine and 0.2 mM uridine in the  $^{13}\text{C}_6$ -glucose medium are needed to suppress signals from de novo synthesized nucleosides (Fig. S6).

Hence, we used  $^{15}\text{N}_5$ -adenine and  $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_2$ -uridine (Fig. 2a) in medium with unlabeled glucose. The high-resolution mass spectra of the resulting RNA nucleosides showed the desired labeling for >95% of all canonical nucleosides after 7 days (Fig. 2b). A +7 mass increase is observed for cytidine and uridine and a +5 and +4 mass increase for adenosine and guanosine, respectively. By using dialyzed FBS, the signal of unlabeled adenosine could be further reduced in comparison to normal FBS (Fig. S7). Similarly, DNA nucleosides become stable isotope labeled (Fig. S8).

With these metabolites, a pulse chase NAIL-MS study is possible in human cell culture. To this end, we achieve excellent labeling in HEK 293, HAP and HeLa cell lines using supplemented DMEM, RPMI or IMDM medium (Fig. S9).

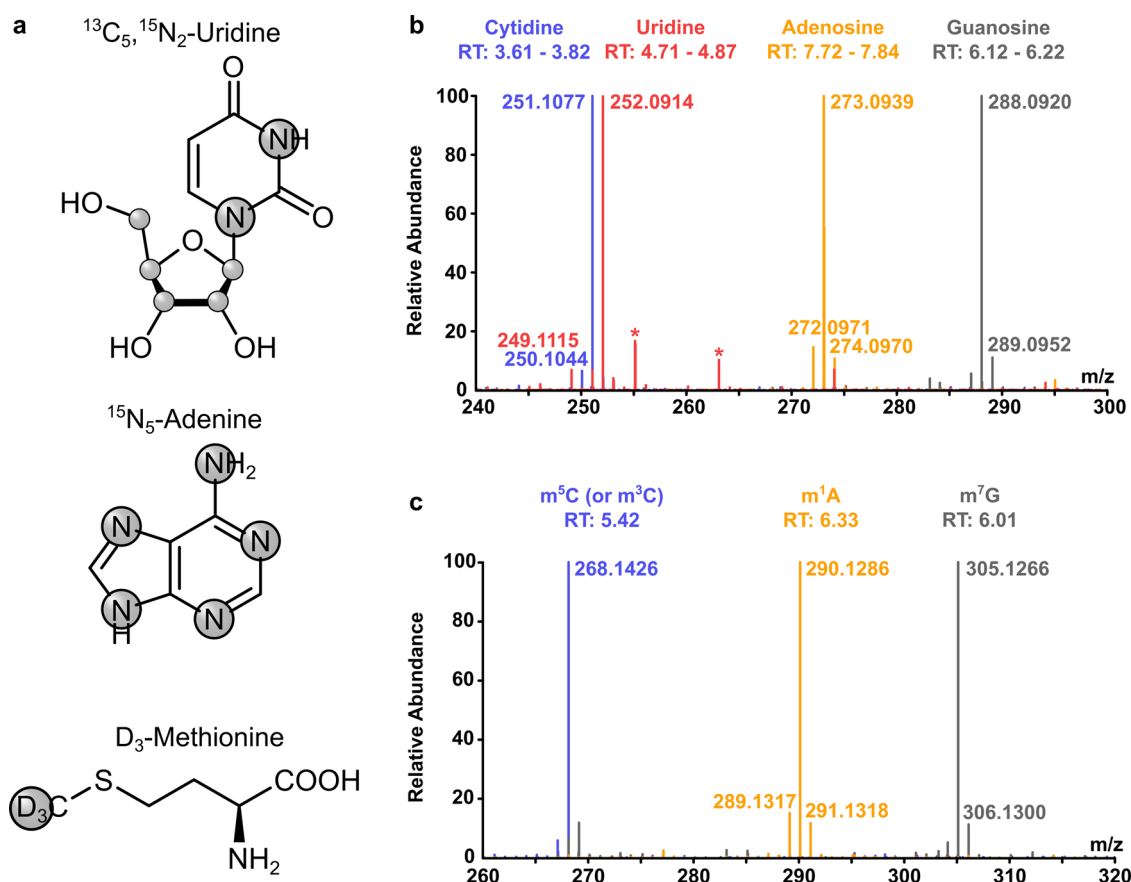
In mouse embryonic stem cells (mESC), the addition of  $^{15}\text{N}_5$ -adenine and  $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_2$ -uridine leads to non-monoisotopic labeling. Here, the labeling efficiency is improved from 35 to 70% by the usage of dialyzed FBS (Fig. S10).

In HEK 293 cells, the signals of new tRNA transcripts became detectable and quantifiable after 120 min of labeling (Figs. S11/S12).

Most modified nucleosides in RNA carry one or more methylations. To follow the fate of these methylated nucleosides in the context of RNA maturation and methylation damage response, we used CD<sub>3</sub>-labeled methionine. Methionine is the precursor amino acid of S-adenosylmethionine (SAM) which in turn is cofactor of most RNA methyltransferases. In the presence of CD<sub>3</sub>-methionine, most methylated nucleosides get a mass increase of +3 and can thus be distinguished from nucleosides modified in the presence of unlabeled methionine. High resolution mass spectra of fully labeled m<sup>5</sup>C, m<sup>7</sup>G, and m<sup>1</sup>A are exemplarily shown in Fig. 2c. In order to achieve complete labeling of methyl-groups, methionine depleted medium has to be used. We chose DMEM D0422 (from Sigma-Aldrich, Munich, Germany) which lacks glutamine, cystine and methionine (Fig. S13). Neither cell shape nor growth speed were influenced by the labeling and both were comparable to standard DMEM (e.g., D6546, from Sigma-Aldrich) (Fig. S14).

The combination of nucleoside and methyl-group labeling allows the design of elegant pulse chase studies to follow the fate of RNA in human cells.

**Validation of human cell culture NAIL-MS.** After finding a suitable way for monoisotopic labeling of RNA in human cells, we wanted to rule out the possibility of the labeling itself impacting the abundance of RNA modifications. For this purpose, cells were grown in labeled or unlabeled media for 7 days. Both media



**Fig. 2** High resolution mass spectra of stable isotope labeled nucleosides from cell culture. **a** Labeling of compounds used for stable isotope labeling in cell culture. Grey circles indicate the positions of isotopes ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , or  $^2\text{H}/\text{D}$ ). **b** Merged high resolution mass spectra of the 4 canonical nucleosides of total tRNA after labeling of HEK 293 cells with shown compounds for 7 days. Background signals are marked with asterisks. **c** Merged high resolution mass spectra of three exemplary modifications ( $m^5\text{C}$ ,  $m^7\text{G}$ , and  $m^1\text{A}$ ) in total tRNA after stable isotope labeling of HEK 293 cells for 7 days.

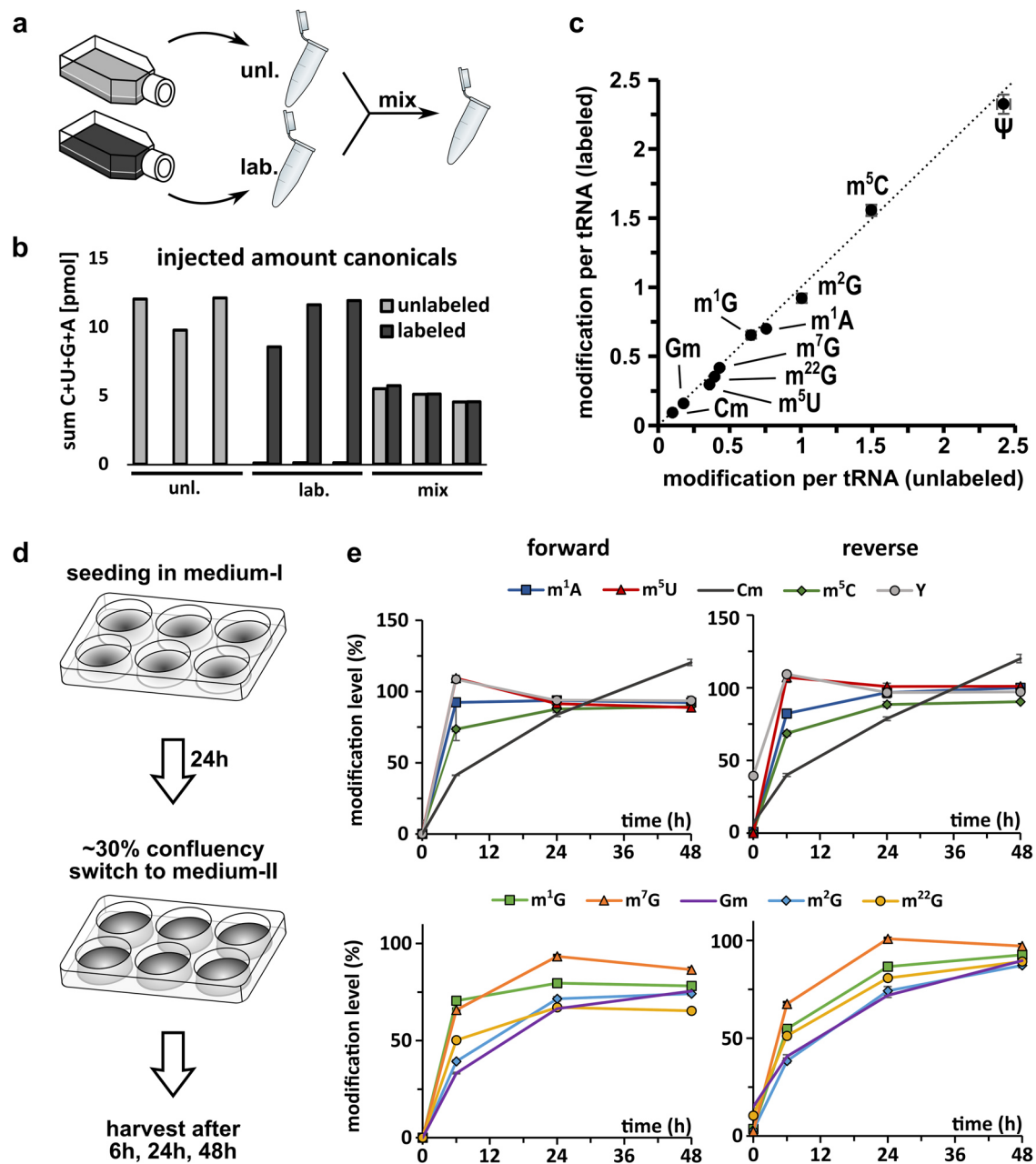
contained adenine, uridine and methionine as either unlabeled or labeled nutrients. Cells were harvested with TRI reagent and split into two aliquots. One aliquot (2/3 Vol) was used for immediate RNA isolation and purification, while the remaining aliquot of the labeled and unlabeled cells were mixed and RNA was co-isolated and co-purified (Figs. 3a and S15). The total tRNA was enzymatically digested to nucleosides and their abundance determined by isotope dilution mass spectrometry<sup>16</sup>. In the aliquot from unlabeled samples, only unlabeled nucleosides were detectable, while the aliquot of the labeled cells showed mainly signals (>98%) for labeled nucleosides. As expected from the mixed sample, we detected unlabeled and labeled isotopologues of all canonicals in similar amounts (Fig. 3b). Next, we quantified the abundance of modified nucleosides. For normalization, unlabeled modifications were referenced to unlabeled canonicals and labeled modifications were referenced to labeled canonicals. The calculated quantities of modified nucleosides present in tRNA<sup>Phe</sup> (according to Fig. 1) are plotted for the unlabeled against labeled tRNA in Fig. 3c. This validation revealed that the quantities of modified nucleosides are independent of the media and that the labeling procedure itself does not interfere with the isotope dilution MS quantification. This finding is in accordance with our northern blot data, where we observe no change in tRNA<sup>Phe</sup> abundance in dependence of the labeling medium (Fig. S1b). The deviation from the expected values (dotted diagonal line) is the error of this NAIL-MS experiment and the limitation to detect differences in a biological setup (also see Fig. S16). E.g., In total tRNA, 2'-O-methyluridine (Um) has

the largest error as its abundance deviates 1.6 fold in labeled and unlabeled media.

The promising results from the validation experiments allowed the design of pulse chase experiments. Such experiments start with cells seeded in medium-I which, upon experiment initiation, is exchanged to medium-II with different isotopically labeled nutrients. The concept is shown in Fig. 3d. To rule out possible differences in the results in dependence of the starting medium, we designed a brief validation experiment. In the forward experiment, cells are seeded in unlabeled medium and switched to labeled medium while the reverse experiment starts in labeled medium (after a 7 day labeling period) before switching to unlabeled.

For analysis of modified nucleoside quantities, we harvested the cells and extracted total tRNA after switching to medium-II (time points 0, 6, 24, and 48 h). To assess the suitability of the method for temporal placement of modified nucleosides into the total tRNA, we focused on the abundance of new modified nucleosides in the newly transcribed tRNA. For direct comparison, the ratio of found (6, 24, 48 h–new transcripts) and expected (0 h–original transcripts) modified nucleoside quantity was formed and plotted over time. As expected, we observed the incorporation of modified nucleosides into the new tRNA after medium exchange. While the timing of the tRNA modification process was comparable in the reverse and forward experiment, the start values were obscured in the reverse experiment due to low, but detectable signals of unlabeled nucleosides. For this and economic considerations, we decided to perform forward pulse chase



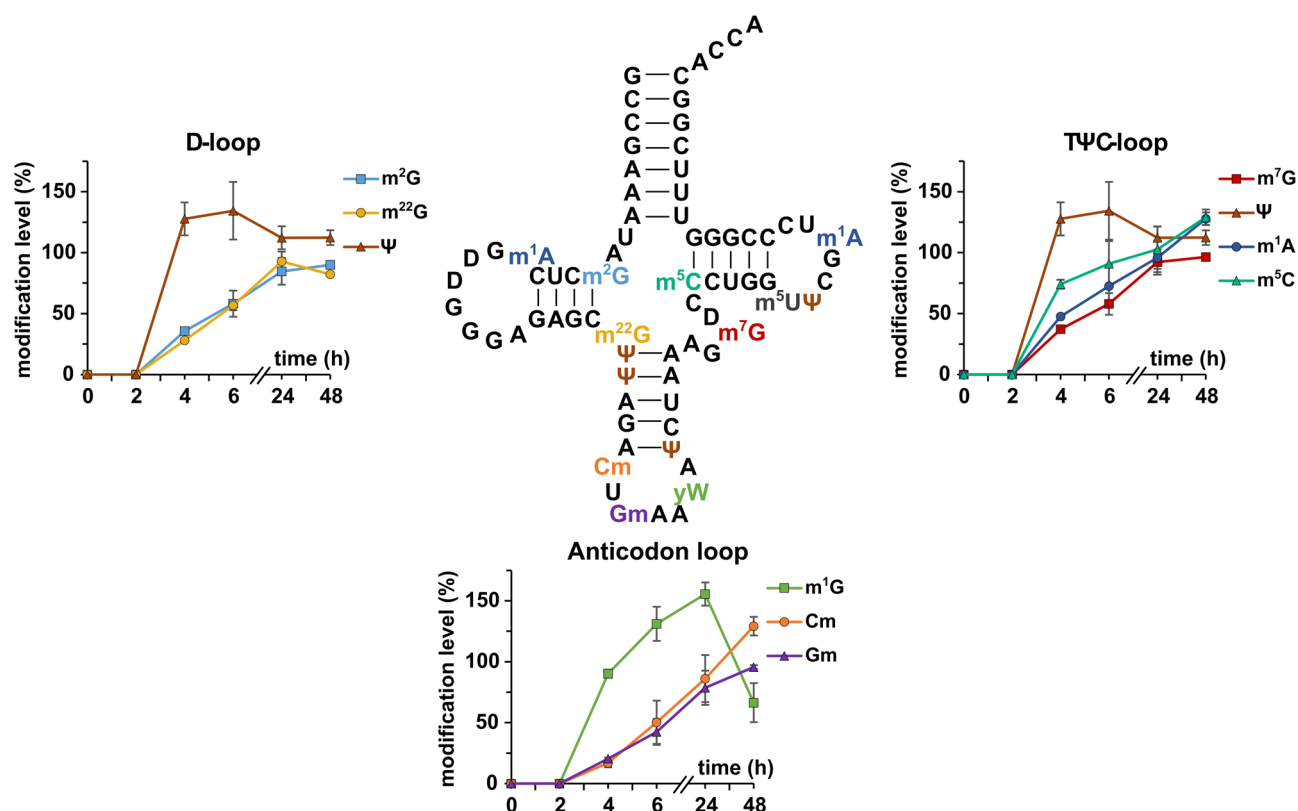


**Fig. 3 Validation of cell culture NAIL-MS.** **a** Cells were grown in unlabeled or fully labeled media for 7 days. Upon harvesting one aliquot was mixed prior to processing (mix). Total tRNA was purified and all samples were analyzed by LC-MS/MS. **b** Summed amount of canonical nucleosides (C + U + G + A) detected by LC-MS/MS for unlabeled and labeled isotopologues. The bars show single replicates of three unlabeled, three labeled and three mixed aliquots. **c** Abundance of labeled modifications plotted against the abundance of unlabeled modifications in the mix samples. The dotted line indicates the location of the expected values as a visual guide. **d** Experimental setup of time course study to investigate temporal placement of RNA modifications. The experiment was done forward (start with unlabeled, change to labeled medium) and reverse (vice versa). **e** Results of time course study. Plotted on the y-axis is the abundance of modification in new transcripts normalized to the abundance before experiment initiation (T = 0). Note: In the reverse experiment, minor signals of unlabeled nucleosides are present at T = 0 and thus the starting value is sometimes larger than 0%. All experiments were done with purified total tRNA and are from  $n = 3$  biol. replicates. Symbols reflect the mean and error bars reflect standard deviation.

experiments in the future to avoid the excessive use of labeled medium.

**Temporal placement of modified nucleosides in RNA.** From a biological perspective, we observed that most modified nucleosides reach their final abundance (100% compared to the starting point) within 48 h (Fig. 3e). Some modified nucleosides, such as m<sup>1</sup>A, m<sup>5</sup>C, Ψ, and m<sup>5</sup>U, are already >90% after 6 h which

indicates a fast incorporation after transcription. These modified nucleosides are located in the structure-stabilizing positions of the tRNA's D-loops and TΨC-loops and thus a fast and reliable modification is to be expected<sup>39</sup>. m<sup>7</sup>G is also involved in structure stabilization<sup>40</sup> and yet, this methylation is placed rather slowly in total tRNA. Other modified nucleosides such as Cm, Gm, and the base-methylated G derivatives (m<sup>1</sup>G, m<sup>2</sup>G, and m<sup>22</sup>G) are incorporated more slowly and the final modification density is not reached within 48 h.



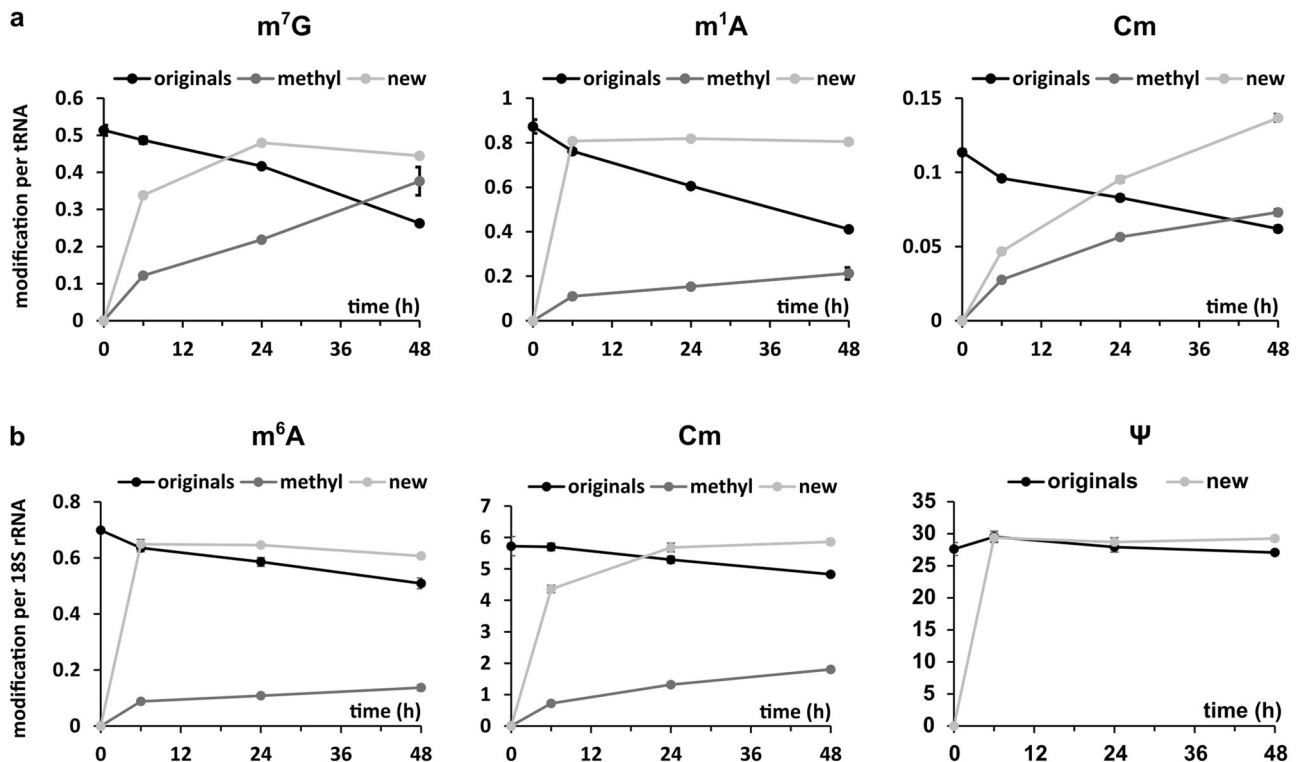
**Fig. 4 Temporal placement of modified nucleosides in tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub>.** Cells were grown in unlabeled DMEM D0422 (supplemented with unlabeled uridine and adenine) for 7 days. At T = 0 the medium was exchanged to DMEM D0422 supplemented with labeled uridine and adenine. Cells were harvested after set time points. tRNA<sup>Phe</sup> was purified and analyzed by LC-MS/MS. Modifications are plotted next to their location in the D-, TΨC- or anticodon loop. Plotted on the y-axis is the abundance of modification in new transcripts normalized to the respective nucleoside originating from unlabeled medium before experiment initiation (T = 0). The experiment was done in *n* = 3 biol. replicates for time points 2, 4, and 48 h and in *n* = 6 biol. replicates for time points 0, 6, and 24 h. Symbols reflect the mean and error bars reflect standard deviation.

While the modified nucleosides of total tRNA are placed by various enzymes at various positions, we were interested to observe the modification process of defined enzymes in a defined substrate. For this purpose, we performed a pulse chase experiment and purified tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> after 0, 2, 4, 6, 24, and 48 h. The abundance of modified nucleosides in new tRNA transcripts is shown in Fig. 4. We observe an immediate high abundance of Ψ, which argues towards an immediate isomerization of e.g., U55 to Ψ55 as observed in yeast<sup>22</sup>. In fact, we observe 1.5-fold more Ψ in the early lifetime of tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> as is expected from mature tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> (Fig. 1). At these early time points, the abundance of new tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> transcripts is low and thus the MS signal intensity is close to the lower limit of quantification (LLOQ). Uridine and its modifications have a low ionization efficiency and thus a higher LLOQ compared to other modified nucleosides. Thus, biological interpretation of Ψ and m<sup>5</sup>U (Fig. S17) quantities must be conducted carefully. D is not included in this analysis, due to its artificial addition to the samples through the deaminase inhibitor tetrahydrouridine (which was omitted for analysis in Fig. 1 and thus allowed quantification of D). While m<sup>7</sup>G is the next modified nucleoside placed in yeast tRNA<sup>Phe</sup>, our data hints towards a fast incorporation of m<sup>5</sup>C followed by m<sup>1</sup>A and finally m<sup>7</sup>G. Here, the dynamic placement of modifications in the TΨC-loop seems to be slightly different between yeast and human. The slow incorporation of m<sup>2</sup>G in the D-stem is in accordance with the reports from yeast. In the anticodon-loop (ac-loop), we observe a rather slow formation of Gm and Cm. These modified nucleosides are not involved in structure stabilization but codon-

anticodon binding<sup>41,42</sup> and protein translation. Our data implies that structure stabilization by modified nucleosides is a key necessity and must thus happen early on, while ac-loop modifications are not immediately needed and are potentially placed on-demand. One exception is the formation of wybutosine (yW). Its precursor modification m<sup>1</sup>G is immediately incorporated into tRNA<sup>Phe</sup> before its abundance drops at later time points, presumably due to its further processing into yW.

**Dynamics of tRNA and 18S rRNA modifications.** With the design of our pulse chase NAIL-MS assay, we can observe RNA maturation processes by quantifying the abundance of modified nucleosides in new transcripts. In addition, we can follow the fate of original RNA (unlabeled nucleosides in forward experiment) and observe methylation or demethylation events.

In Fig. 5a, we plotted the abundance of exemplary modified nucleosides from original total tRNA, which were present before medium exchange. Other modified nucleosides are shown in Fig. S18. Similar to our initial observations in *S. cerevisiae*<sup>31</sup>, we observed a constant loss of modified nucleosides from original tRNAs. In the common, unlabeled analysis of modified nucleosides, the decrease in modification density from original tRNA is not visible as it is masked by the addition of new methyl marks to original tRNAs at early time points (post-methylation) and by quickly modified new transcripts at later time points (ratio original/new transcripts in Figs. S18/19). Here, the post-methylation reaction is captured by the CD<sub>3</sub>-methionine added in the chase phase (medium-II) and is termed “methyl” in Fig. 5a.



**Fig. 5 Dynamics of modified nucleosides in total tRNA and 18S rRNA.** **a** Results for total tRNA. **b** Results for 18S rRNA. Original nucleosides (originals, black line) existed before experiment initiation. Post-methylated nucleosides (methyl, dark grey line) are modifications arising from the methylation of original RNA after experiment initiation. New nucleosides (new, light grey line) show the incorporation of modification into new transcripts. Data points reflect the mean and standard deviations of  $n = 3$  biol. replicates.

Intriguingly, the extent of post-methylation depends on the modified nucleoside. For  $m^7G$  and Cm, it is more pronounced compared to  $m^1A$ . Interestingly, many modified nucleosides which are placed almost immediately after transcription, show low amounts of post-methylation while those with a delayed incorporation showed substantial post-methylation.

Similar to tRNA, ribosomal RNA nucleosides are modified, mainly at locations close to the functional region of the ribosome<sup>25</sup>. From yeast studies, it is known that most ribose rRNA modifications are inserted immediately or even co-transcriptionally<sup>43</sup>. For  $\Psi$  and other base modifications, the time point of placement during rRNA maturation is yet unknown. In a forward pulse-chase experiment, we have isolated 18S rRNA and quantified the abundance of the original and new modified nucleosides. As expected from yeast, ribose methylations appear early on in new 18S rRNA transcripts. Intriguingly,  $m^6A$  and  $\Psi$  are inserted as fast or even faster. This indicates an immediate placement after transcription which is in agreement with their inaccessibility at later stages of ribosome biogenesis (Fig. S19).

#### Impact of methylation stress on tRNA modification processes.

We have recently applied NAIL-MS to profile bacterial tRNA damage by methylating agents<sup>29</sup> and described the repair mechanisms in vivo<sup>37</sup>. With the goal to study the stress response in human cells, we determined the effect of methyl methane-sulfonate (MMS) on growth of HEK 293 cells (Fig. S20). In these experiments, we observed a strong influence of trypsinization on cell survival, which we avoided in later experiments.

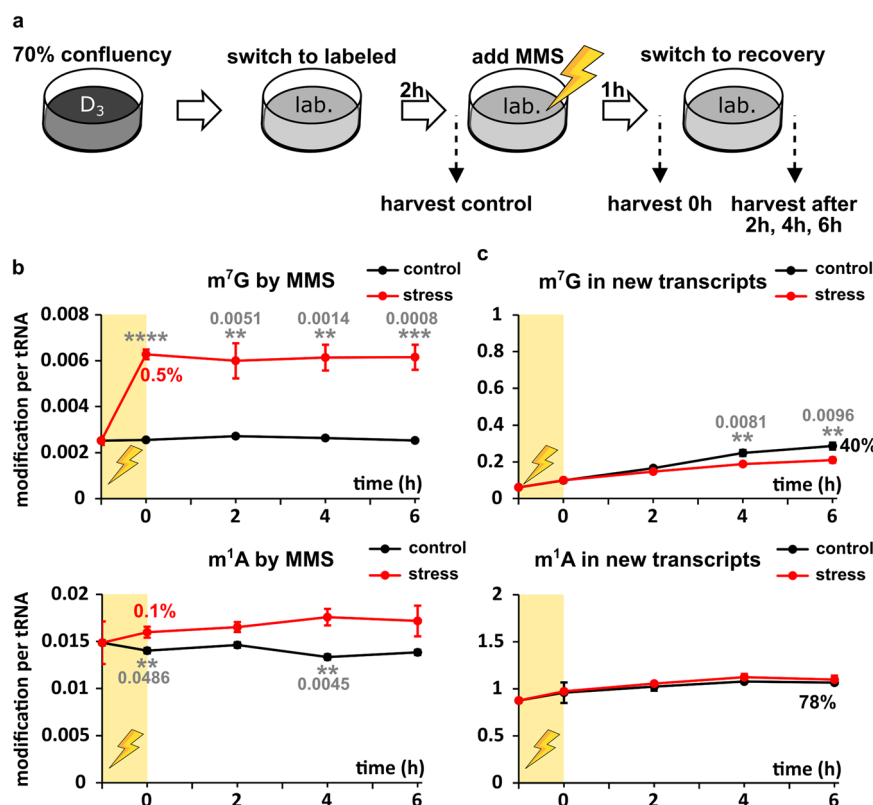
Until now, it was not possible to study the extent of  $m^1A$  and  $m^7G$  damage formation in human RNA due to the presence of enzymatically placed  $m^1A$  and  $m^7G$ . With our cell culture labeling scheme, we succeeded to implement a methylome discrimination assay and determine the absolute abundance of

these major RNA damages. For this purpose, cells were grown in  $CD_3$ -methionine supplemented medium for 7 days before addition of 1 mM MMS. While enzymatically placed methylations are  $CD_3$ -labeled, MMS damaged sites are  $CH_3$ -labeled and thus easily distinguishable from the enzymatic sites by mass spectrometry. To enable the tracing of the damaged tRNAs without interference of new transcripts, we included a switch to fully labeled media ( $^{13}C/^{15}N$ -nucleoside body +  $CD_3$ ) for labeling of new transcripts. The timeline and concept is given in Fig. 6a. Samples of MMS and MOCK treated cells were taken before and after 1 h of MMS exposure and up to 6 h after removal of MMS, where cells were left to recover from MMS treatment.

From these samples, we purified  $tRNA^{Phe}_{GAA}$  and quantified the abundance of canonical and modified nucleosides. By comparison of canonical nucleosides, we could observe a higher ratio of new transcripts over original transcripts in the unstressed samples compared to the stressed samples (Fig. S21). This is to be expected as stressed cells stop growing and thus less transcription and translation are taking place. In addition, the prolonged abundance of original tRNA suggests that methylation stress does not lead to extensive degradation of tRNAs.

The quantification of methylated nucleosides derived from direct MMS methylation indeed showed formation of the known damage products  $m^7G$  and potentially  $m^1A$ . In comparison to the natural abundance of these modified nucleosides ( $\sim 0.5$   $m^7G$  and 1  $m^1A$  per  $tRNA^{Phe}_{GAA}$ ), the damage accounts for less than 1% of these methylated nucleosides (Fig. 6b). In other words, only 1 out of around 200 tRNA molecules gets an additional  $m^7G$  by MMS damage. For  $m^1A$  the damage is found in 1 out of 1000 tRNAs (0.1%). No other reported MMS damage products were detected in human  $tRNA^{Phe}$ .

While RNA methylation damage repair was observed in *E. coli*, using a similar NAIL-MS approach, no demethylation was



**Fig. 6 Effect of methylation stress on tRNA modifications.** **a** 70% confluent CD<sub>3</sub>-methionine labeled cells were incubated with fully labeled media for 2 h before the LD<sub>50</sub> dose of methyl methanesulfonate (MMS, yellow shaded area) was added. Control samples were treated the same, substituting the MMS stock solution with PBS. After 1 h the stress (or control) media was replaced by fresh labeled media. After set time points, cells were harvested and tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> was purified and subjected to LC-MS/MS analysis. **b** Unlabeled modifications were referenced to unlabeled canonicals to calculate the amount of modifications arising from direct methylation damage by MMS. Red numbers at time point 0 give the percentage of damaged nucleoside referenced to the naturally occurring amount of the respective modification (amount of original modification before experiment initiation). **c** Labeled modifications were referenced to labeled canonicals to calculate the amount of modification in new tRNA transcripts. The numbers at time point 6 give the percentage of modification amount in the control sample referenced to the naturally occurring amount of the respective modification. All experiments are from *n* = 3 biol. replicates. Symbols reflect the mean and error bars reflect standard deviation. *P*-values from student *t*-test (equal distribution, two-sided): \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, and \*\*\*\**p* < 0.0001. Where reasonable, exact *P*-values are given as grey numbers in the figure.

detectable in the human cell line. Even 6 h after removal of the methylating agent, the abundance of non-enzymatically methylated m<sup>7</sup>G and m<sup>1</sup>A stayed unchanged in the original transcripts. This observation indicates that human cells either have a highly expressed and fast acting RNA demethylase for RNA damage repair or no RNA demethylase at all. Also, the abundance of damaged nucleosides could be below a threshold limit to trigger damage repair in human cells.

We next asked the question, whether human cells react to methylation stress by adaptation of tRNA modifications. This adaptation can be mechanistically achieved by addition or removal of modified nucleosides to original tRNAs, by delayed modification of new tRNAs or a combination of both. For methylation stress, we did not see a difference in modified nucleoside abundance in original tRNA compared to the unstressed control (Fig. S22). (Note: In this NAIL-MS study, the supplemented methionine was CD<sub>3</sub>-labeled in both the pulse and the chase phase. Thus, it is not possible to observe the decrease of enzymatically placed modifications in original tRNA over time as shown in Fig. 5).

Finally, we studied the abundance of modified nucleosides in new tRNA transcripts in dependence of stress. For methylated guanosine derivatives (m<sup>7</sup>G, m<sup>1</sup>G, m<sup>2</sup>G, and m<sup>22</sup>G), we observed a slightly reduced, but statistically significant (e.g., m<sup>7</sup>G *p*<sub>6h</sub> = 0.0096) incorporation into tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> under stress compared to

the control samples (Figs. 6c and S22). For Cm and Gm, we observed a higher abundance under stressed conditions while m<sup>1</sup>A or m<sup>5</sup>C were comparable. Our results imply that human cells (i) adapt their tRNA modifications to methylation stress by differentially modifying new transcripts and (ii) consider tRNA modification as a highly important process and thus continue even during stress exposure.

## Discussion

Current analyses of the epitranscriptome are limited to snapshot moments and cannot truly follow dynamic processes inside cells. While NAIL-MS allows the observation of RNA modification adaptation processes<sup>37,44</sup> it was not possible to apply the technique in human cell culture due to the complexity of culture medium. <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose is a reasonable and economic option for stable isotope labeling (28 € per 50 mL medium)<sup>45</sup> but it suffers from the formation of multiple isotopologues which complicates its application especially when additional feeding with CD<sub>3</sub>-methionine is required. In such studies, the signals of partially <sup>13</sup>C-labeled nucleosides and CD<sub>3</sub>-methylated nucleosides can overlap and quantification becomes impossible. In contrast, supplementation of various media with <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-adenine and <sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uridine results in monoisotopic labeling with no overlap with naturally occurring <sup>13</sup>C-isotopologues or artificially CD<sub>3</sub>-methylated nucleosides (305 € per 50 mL medium). Thus, a



broad applicability and even quantification by isotope dilution mass spectrometry is possible. While we observe best results with dialyzed FBS, it is also possible to use regular FBS instead if it is preferable to the cells. If the nucleoside of interest is a G or A derivative,  $^{13}\text{C}_6$ -glucose labeling can be combined with supplementation of unlabeled adenine. This approach is less costly and produces monoisotopically labeled A and G derivatives with a  $^{13}\text{C}_5$ -ribose moiety (Figs. S5 and S6).

An important consideration for any NAIL-MS study is the constant supplementation with adenine and uridine, even when unlabeled medium is used to prevent activation of de novo synthesis pathways. Independently of the chosen nucleic acid labeling scheme, we strongly recommend validation experiments as shown in Fig. 3c. Such an experiment is crucial to later judge the statistical significance of e.g., pulse chase studies. For example, our validation experiment indicates that a less than 1.6 fold change in Um would not be biologically significant (Fig. S16). In such a case we recommend the direct comparison to a control sample (such as those in Fig. 6) to judge the accuracy of the received NAIL-MS data.

Furthermore, we suggest careful interpretation of new transcript data at early time points of pulse chase experiments. As described for  $\Psi$  and  $\text{m}^5\text{U}$  (Fig. S17), it is possible that some modified nucleosides are early on too close to the lower limit of quantification (LLOQ) in new transcripts and thus the received quantities must be interpreted carefully.

We have studied the temporal placement of modified nucleosides in  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  as a model. Our data implies that structure stabilization by modified nucleosides is a key necessity and must thus happen early on, while anticodon-loop modifications are not immediately needed and are potentially placed on-demand. One exception is the formation of wybutosine (yW). Its precursor modification  $\text{m}^1\text{G}$  is immediately incorporated into  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  before its abundance drops at later time points, presumably due to its further processing into yW. By NMR spectroscopy in combination with stable isotope labeling, Barraud et al. recently observed an inhibition of  $\text{m}^{22}\text{G}$  formation by  $\text{m}^2\text{G}^{22}$ . In our hands,  $\text{m}^{22}\text{G}$  is placed into  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  as fast as is  $\text{m}^2\text{G}$ , but as both modifications are incorporated slowly it is possible that  $\text{m}^{22}\text{G}$  is placed in a non- $\text{m}^2\text{G}$  modified sub-population. This question might be approached by combining NAIL with oligonucleotide MS.

With NAIL-MS we are not limited to RNA modification studies in new transcripts. In addition, we can follow the fate of RNA modifications in mature transcripts. In human cells, we observe a constant loss of modified nucleosides from tRNAs, similar to our initial report in *S. cerevisiae*<sup>31</sup>. The extent of the decrease is similar for all modified nucleosides in tRNA (~50% lower within 48 h) including non-methylated modifications, which argues towards a preferential degradation of modified tRNA. In 18S rRNA, we see a similar loss of modified nucleosides from original transcripts which is with ~20% within 48 h less pronounced as in tRNA. The ~2-fold longer half-life of rRNA compared to tRNA<sup>46</sup> supports our hypothesis of preferred degradation of modified RNA which is most likely connected to the life time of RNA.

The constant loss of pre-existing modifications from original RNA is masked in the early time points of the experiment by observable post-transcriptional methylation of original RNA. For many modified nucleosides, the extent of post-methylation of existing transcripts is connected to the extent of modification in new transcripts (Figs. S18 and S19). Some modified nucleosides such as  $\text{m}^7\text{G}$ ,  $\text{m}^3\text{U}$ ,  $\text{m}^3\text{C}$ ,  $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$  and Um show no correlation between post-methylation and new methylation abundance. Except  $\text{m}^7\text{G}$ , all these modified nucleosides are placed in or close to the anticodon-loop which indicates that the modification extent at these positions reflects rather demand than maturation. Another hypothesis for the post-methylation arises from reports

on tRNA demethylation. For  $\text{m}^1\text{A}$  and  $\text{m}^3\text{C}$ , demethylation by members of the ALKBH family has been proposed<sup>9,47,48</sup>. Such a demethylated site might be target to re-methylation and this process would lead to the formation of post-methylated nucleosides. While the common analysis of tRNA modifications by sequencing and quantitative mass spectrometry provides a static view on the substrates of ALKBH enzymes, future NAIL-MS experiments will shed light onto the dynamic performance of these enzymes in vivo.

Such a detailed analysis is especially important for understanding the processes behind stress induced adaptation of tRNA modifications. To this end, we have studied the impact of methylation stress on tRNA modifications. Even at a harsh dose of MMS (1 mM), we observe only 1 damage derived  $\text{m}^1\text{A}$  and 5  $\text{m}^7\text{G}$  per 1000 tRNAs. Other damage products were not observed. Intriguingly, these damages do not seem to be repaired in human cells.

In our hands, methylation stress has no impact on the abundance of modified nucleosides in tRNA present during the stress exposure. In contrast, the abundance of some modified nucleosides is slightly, but significantly changed in new transcripts. This indicates that cells regulate their tRNA modifications on the level of new transcripts and not existing transcripts. Overall modification processes of tRNA are not stalled during stress recovery which indicates that properly modified tRNAs are of high importance to the cell.

NAIL-MS is a powerful technique which depends, as common to state-of-the-art mass spectrometry of modified nucleosides, on a complete enzymatic digest to the nucleoside building block. Thus, all sequence context surrounding modified nucleosides is lost and the technique relies strongly on the purity of the sample. This is especially important for mRNA<sup>49</sup>. If reliable mRNA purification is possible, the true dynamics of  $\text{m}^6\text{A}$  and other mRNA modifications becomes finally available through NAIL-MS.

## Methods

**Salts, reagents, media, and nucleosides.** All salts, reagents and media were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) at molecular biology grade unless stated otherwise. The isotopically labeled compounds  $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Uridine (Ribose- $^{13}\text{C}_5$ , 98%;  $^{15}\text{N}_2$ , 96–98%) and  $^{15}\text{N}_5$ -Adenine ( $^{15}\text{N}_5$ , 98%) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA). Unlabeled glutamine, isotopically labeled L-glutamine-amide- $^{15}\text{N}$  (98 atom%  $^{15}\text{N}$ ), L-aspartic- $^{15}\text{N}$  acid (98 atom%  $^{15}\text{N}$ ) and ( $\text{D}_3$ )-L-methionine (98 atom% D) were obtained from Sigma-Aldrich. Isotopically labeled  $^{13}\text{C}_6$ -glucose ( $\geq 99$  atom%  $^{13}\text{C}$ ) was obtained from Eurisotope (Saarbrücken, Germany). All solutions and buffers were made with water from a Sartorius arium® pro ultrapure water system (Goettingen, Germany). The nucleosides adenosine (A), cytidine (C), guanosine (G) and uridine (U), were obtained from Sigma-Aldrich. 1-Methyladenosine ( $\text{m}^1\text{A}$ ), N3-methylcytidine ( $\text{m}^3\text{C}$ ), N6-methyladenosine ( $\text{m}^6\text{A}$ ), 7-methylguanosine ( $\text{m}^7\text{G}$ ), 5-methylcytidine ( $\text{m}^5\text{C}$ ), 5-methyluridine ( $\text{m}^5\text{U}$ ), 2'-O-methylcytidine (Cm), 2'-O-methylguanosine (Gm), 1-methylguanosine ( $\text{m}^1\text{G}$ ), N2-methylguanosine ( $\text{m}^2\text{G}$ ), 2-dimethylguanosine ( $\text{m}^{22}\text{G}$ ), pseudouridine ( $\Psi$ ), inosine (I), 2'-O-methyluridine (Um), 2'-O-methyladenosine (Am), and 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine ( $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) were obtained from Carboxynth (Newbury, UK). Dihydrouridine (D) was obtained from Apollo Scientific (Stockport, UK). N6-threonylcarbamoyladenine ( $\text{t}^6\text{A}$ ) was obtained from TRC (North York, Canada). N3-methyluridine ( $\text{m}^3\text{U}$ ) and N6-isopentenyladenosine ( $\text{i}^6\text{A}$ ) were generous gifts from the Dedon lab. 5-carbamoylmethyl-2-thiouridine ( $\text{ncm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) was a generous gift from the Helm lab. 1-Methylinosine ( $\text{m}^1\text{I}$ ) was a generous gift from STORM Therapeutics LTD (Cambridge, UK).

**Cell culture.** All cell culture media and supplements were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) unless stated otherwise. Standard Basal medium for HEK 293 culture was DMEM D6546 high glucose supplemented with 10% FBS and 0.584 g/L L-glutamine. Cells were split 1:7 using standard procedures every 2–3 days to counter overgrowth. Cells cultured in DMEM medium were kept at 10%  $\text{CO}_2$  for proper pH adjustment. For all experiments where labeling of nucleosides was involved DMEM D0422 without methionine and cystine was used. DMEM D0422 was supplemented with 10% dialyzed FBS (Biowest, Nuaille, France), 0.584 g/L L-glutamine, 0.063 g/L cystine (stock concentration 78.75 g/L dissolved in 1 M HCl), 0.03 g/L methionine, 0.05 g/L uridine, and 0.015 g/L adenine. Uridine, adenine and methionine were either added as unlabeled or labeled compounds depending on the desired labeling. HeLa cells were cultured and labeled using the same media.

For Labeling in RPMI R0883, dialyzed FBS, glutamine, methionine, uridine, and adenine were added in the same concentrations as for DMEM D0422.

HAP1 cells were either labeled using DMEM D0422 as described above or IMDM I3390 where FBS, glutamine, uridine, adenine and methionine were added in the same concentrations as used for DMEM D0422 medium. Cells grown in RPMI or IMDM medium were kept at 5% CO<sub>2</sub> for proper pH adjustment.

Mouse embryonic stem cells (mESC) were cultured as recently reported<sup>50</sup>. Isotopically labeled compounds were added as described for regular cell culture labeling.

For biological replicates one culture was split into several flask at least 24 h prior to experiment initiation.

**Cell lysis and RNA purification.** Cells were directly harvested on cell culture dishes using 1 mL TRI reagent for T25 flasks or 0.5 mL TRI reagent for smaller dishes. The total RNA was isolated according to the supplier's manual with chloroform (Roth, Karlsruhe, Germany). tRNA and 18S rRNA were purified by size exclusion chromatography (AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm for tRNA and BioSEC 1000 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm for 18S rRNA, Agilent Technologies) according to published procedures<sup>31,51</sup>. The RNA was resuspended in water (35 µL).

**Isoacceptor purification.** The procedure was adapted from Hauenschild et al.<sup>13</sup>. For tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> purification, a mixture of 1 µg SEC-purified total tRNA and 100 pmol complementary oligonucleotide was heated to 90 °C for 3 min in a total volume of 100 µL 5× SSC buffer (0.75 M NaCl, 75 mM trisodiumcitrate pH 7) and subsequently incubated for 10 min at 65 °C. The sequence of the biotinylated 2'-deoxyoligonucleotide is 5'-(Biotin) AAATGGTGCCGAAACCGGGATCGA ACCAGGGT-3' (Sigma Aldrich, Munich, Germany). For each sample, 25 µL Magnetic Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) were primed three times in Binding and Wash buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) and once in 5× SSC buffer. An aliquot of 25 µL magnetic beads in 5× SSC buffer was added to the prepared mixture of tRNA and oligonucleotide and incubated for 30 min at room temperature. Beads were then washed once with 1× SSC buffer and three times with 0.1× SSC buffer before elution of purified tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> in 20 µL Milli-Q water at 75 °C for 3 min.

**Northern blot analysis.** Isolated RNA samples and control oligonucleotides (in vitro synthesized tRNA<sup>Ser</sup><sub>UGA</sub>, tRNA fragment Glycin<sub>GCC</sub>) were separated by implementing a 12% TBE-urea PAGE in 1× TBE buffer (Roth, Karlsruhe, Germany). Samples were denatured at 90 °C for 1 min, directly loaded on the gel and run at 275 V for 40 min. The RNA was then transferred onto a Hybond-N + nylonmembrane (GE Healthcare, Chicago, US) at 375 mA, 4 °C in 1× TBE buffer for 2 h and subsequently crosslinked twice with UV light at the energy of 120 mJ/cm<sup>2</sup>. The membrane was incubated in hybridization buffer (5x Denhardt's solution, 1% SDS, 6.6× SSPE) for 30 min before 100 pmol of the respective probe was added. Fluorescent probes (3' and 5' Cyanine-3 modified, from Sigma-Aldrich, Munich, Germany) were designed to overlap with ~30 nt of the target RNA using the same sequence for tRNA<sup>Phe</sup> as used for isoacceptor purification. The sequence of all probes used can be found in Table S2. Hybridization was performed overnight at 37 °C in a shaking incubator. After two wash steps in 2× SSPE, 0.5% SDS for 10 min at room temperature the membrane was imaged at an Amersham Imager 680. Stripping was done by pouring boiling 0.1× SSPE buffer onto the membrane and incubation for 5 min. To get rid of remaining signal completely this procedure was repeated 10 times before reprobing.

**Sequencing.** Analysis of tRNA<sup>Phe</sup><sub>GAA</sub> purity by deep sequencing was performed by mild RNA fragmentation under strong alkaline conditions (5 min, 96 °C, pH 9.2). Resulting fragments were 3'-dephosphorylated by Antarctic phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) and 5'-phosphorylated by PNK/ATP treatment<sup>52</sup>. Library preparation was done using NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (NEB) according to the manufacturer's instructions. Quality of the library preparation was assessed by HS DNA chip on Bioanalyzer 2100 (Agilent). Sequencing was done using HiSeq1000 in single-read SR50 mode. Resulting raw reads (~10 mln/sample) were trimmed by trimmomatic v.0.32 to remove the adapted sequence and aligned using bowtie2 to the reference containing human rRNA sequences and non-redundant subset of human tRNAs. Over 90% of the reads was mapped by this approach, demonstrating that contamination by other cellular RNAs remains minor.

**tRNA digestion for mass spectrometry.** Total tRNA (300 ng) in aqueous digestion mix (30 µL) was digested to single nucleosides by using 2 U alkaline phosphatase, 0.2 U phosphodiesterase I (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), and 2 U benzonase in Tris (pH 8, 5 mM) and MgCl<sub>2</sub> (1 mM) containing buffer. Furthermore, 0.5 µg tetrahydrouridine (Merck, Darmstadt, Germany), 1 µM butylated hydroxytoluene, and 0.1 µg pentostatin were added to avoid deamination and oxidation of the nucleosides. When quantification of dihydrouridine was intended tetrahydrouridine was omitted. After incubation for 2 h at 37 °C, 20 µL of LC-MS buffer A (QQQ) was added to the mixture and then filtered through 96-well filter plates (AcroPrep Advance 350 10 K Omega, PALL Corporation, New York, USA) at

3000 × g and 4 °C for 30 min. A stable isotope labeled internal standard (SILIS) was produced in *S. cerevisiae* using <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N rich growth medium (Silantes, Munich, Germany, Product# 111601402) following recently described procedures<sup>16,31</sup>. 1/10 Vol. of SILIS was added to each filtrate before analysis by QQQ mass spectrometry. For each sample 10 µL were injected (~60 ng of sample tRNA).

**High resolution mass spectrometry.** The ribonucleosides were separated using a Dionex Ultimate 3000 HPLC system with a Synergi, 2.5 µm Fusion-RP, 100 Å, 100 × 2 mm column (Phenomenex®, Torrance, California, USA). Mobile phase A was 10 mM ammonium formate and mobile phase B was 80% acetonitrile containing 2 mM ammonium formate. Gradient elution started with 0% B and increased to 12% B after 10 min and to 80% after 12 min. After 4 min elution at 80% B and subsequently regeneration of starting conditions to 100% A after 5 min, the column was equilibrated at 100% A for 8 min. The flow rate was 0.2 mL/min and the column temperature 30 °C. High-resolution mass spectra were recorded by a ThermoFinnigan LTQ Orbitrap XL operated in positive ionization mode. The parameters of the mass spectrometer were tuned with a freshly mixed solution of uridine (10 µM). Capillary voltage was set to 20 V and capillary temperature to 300 °C. Sheath gas and sweep gas flow rate was set to 0, and auxiliary gas flow rate to 35. Source voltage was set to 4.0 kV and tube lens to 75 V.

**QQQ mass spectrometry.** For quantitative mass spectrometry an Agilent 1290 Infinity II equipped with a diode-array detector (DAD) combined with an Agilent Technologies G6470A Triple Quad system and electrospray ionization (ESI-MS, Agilent Jetstream) was used. Operating parameters: positive-ion mode, skimmer voltage of 15 V, cell accelerator voltage of 5 V, N<sub>2</sub> gas temperature of 230 °C and N<sub>2</sub> gas flow of 6 L/min, sheath gas (N<sub>2</sub>) temperature of 400 °C with a flow of 12 L/min, capillary voltage of 2500 V, nozzle voltage of 0 V, and nebulizer at 40 psi. The instrument was operated in dynamic MRM mode (Table S3).

For separation a Synergi, 2.5 µm Fusion-RP, 100 Å, 100 × 2 mm column (Phenomenex®, Torrance, California, USA) at 35 °C and a flow rate of 0.35 mL/min was used in combination with a binary mobile phase of 5 mM NH<sub>4</sub>OAc aqueous buffer A, brought to pH 5.3 with glacial acetic acid (65 µL/L), and an organic buffer B of pure acetonitrile (Roth, Ultra LC-MS grade, purity ≥99.98). The gradient started at 100% solvent A for 1 min, followed by an increase to 10% solvent B over 4 min. From 5 to 7 min, solvent B was increased to 40% and maintained for 1 min before returning to 100% solvent A in 0.5 min and a 2.5 min re-equilibration period.

**Calibration.** For calibration, synthetic nucleosides were weighed and dissolved in water to a stock concentration of 1–10 mM. The calibration solutions ranged from 0.025 to 100 pmol for each canonical nucleoside and from 0.00125 pmol to 5 pmol for each modified nucleoside. Each calibration was spiked with 10% SILIS. The sample data were analyzed by the quantitative and qualitative MassHunter Software from Agilent. The areas of the MRM signals were integrated for each modification. The values of integrated MS signals from target nucleosides were set into relation to the respective MS signals of the respective isotope labeled SILIS nucleosides after Eq. (1) to receive the nucleoside isotope factor (NIF):

$$\text{NIF}_{\text{nucleoside}} = \frac{\text{signal area}_{\text{nucleoside}}}{\text{signal area}_{\text{respective SILIS}}} \quad (1)$$

Results from Eq. (1) were plotted against the expected molar amount of nucleosides and regression curves were plotted through the data points. The slopes represent the respective relative response factors for the nucleosides (rRFN) and enable an absolute quantification. The principle is described in more detail in our published protocol<sup>16</sup>. The plotting of these calibration curves is done automatically by the quantitative MassHunter Software and should be checked manually for linearity.

**Data analysis.** Molar amounts of nucleosides in samples were calculated after Eq. (2) using the signal areas of target compounds and SILIS in the samples and the respective rRFN, determined by calibration measurements. This step is done automatically by the quantitative MassHunter Software.

$$n_{\text{sample nucleoside}} = \frac{\text{signal area}_{\text{sample nucleoside}}}{\text{rRFN}_{\text{nucleoside}} \cdot \text{signal area}_{\text{respective SILIS}}} \quad (2)$$

To make different samples quantitatively comparable, the molar amount of each modified nucleoside was normalized by the molar amount of injected RNA to receive the number of modifications per RNA. Therefore, the calculated amounts of injected canonicals were divided by their expected occurrence in the respective RNAs and averaged afterwards (see Eq. (3) for tRNA). The numbers for each canonical nucleoside were either taken from the sequence of 18S rRNA, tRNA<sup>Phe</sup> (reported modifications subtracted)<sup>32</sup>, or determined empirically for total tRNA analyses.

$$n_{\text{tRNA}} = \frac{\frac{n_{\text{C}}}{\# \text{C}} + \frac{n_{\text{U}}}{\# \text{U}} + \frac{n_{\text{G}}}{\# \text{G}} + \frac{n_{\text{A}}}{\# \text{A}}}{4} \quad (3)$$

In the case of NAIL-MS experiments, the different isotopologues were referenced to their respective labeled canonicals, so that original (unlabeled) modifications were referenced to original tRNA molecules and new (labeled) modifications were referenced to new tRNA molecules (see Eqs. (4) and (5)).

Table S4 gives a summary of the calculations exemplarily for m<sup>7</sup>G.

$$\# \text{mod/tRNA (original)} = \frac{n_{\text{sample nucleoside (unlabeled)}}}{n_{\text{tRNA (unlabeled)}}} \quad (4)$$

$$\# \text{mod/tRNA (new)} = \frac{n_{\text{sample nucleoside (labeled)}}}{n_{\text{tRNA (labeled)}}} \quad (5)$$

**Statistics.** All experiments were performed at least 3 times (biological replicates) to allow student t-test analysis. *P*-values of student t-test (unpaired, two-tailed, equal distribution) were calculated using Excel.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

Sequencing data are available under accession [PRJEB41141](https://www.ebi.ac.uk/ena/record/PRJEB41141) at ENA database. The data supporting the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

Received: 22 April 2020; Accepted: 4 December 2020;

Published online: 15 January 2021

## References

- Mauer, J. et al. Reversible methylation of m(6)Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* **541**, 371–375 (2017).
- Zheng, G. et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol. Cell* **49**, 18–29 (2013).
- Jia, G. et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 885–887 (2011).
- Tang, C. et al. ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, E325–E333 (2018).
- Wei, J. et al. Differential m(6)A, m(6)Am, and m(1)A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm. *Mol. Cell* **71**, 973–985 e975 (2018).
- Mauer, J. & Jaffrey, S. R. FTO, m(6) Am, and the hypothesis of reversible epitranscriptomic mRNA modifications. *FEBS Lett.* **592**, 2012–2022 (2018).
- Zhou, J. et al. N(6)-methyladenosine guides mRNA alternative translation during integrated stress response. *Mol. Cell* **69**, 636–647 e637 (2018).
- Zhang, X. et al. Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116**, 2919–2924 (2019).
- Liu, F. et al. ALKBH1-mediated tRNA demethylation regulates translation. *Cell* **167**, 816–828 e816 (2016).
- Gattoni, R., Keohavong, P. & Stevenin, J. Splicing of the E2A premessenger RNA of adenovirus serotype 2. Multiple pathways in spite of excision of the entire large intron. *J. Mol. Biol.* **187**, 379–397 (1986).
- Chan, C. T. et al. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet.* **6**, e1001247 (2010).
- Carell, T. et al. Structure and function of noncanonical nucleobases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 7110–7131 (2012).
- Hauenschild, R. et al. The reverse transcription signature of N-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9950–9964 (2015).
- Clark, W. C., Evans, M. E., Dominissini, D., Zheng, G. & Pan, T. tRNA base methylation identification and quantification via high-throughput sequencing. *RNA* **22**, 1771–1784 (2016).
- Brandmayr, C. et al. Isotope-based analysis of modified tRNA nucleosides correlates modification density with translational efficiency. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 11162–11165 (2012).
- Borland K. et al. Production and application of stable isotope-labeled internal standards for RNA modification analysis. *Genes* **10**, 26 (2019).
- Pan, T. Modifications and functional genomics of human transfer RNA. *Cell Res.* **28**, 395–404 (2018).
- Dittmar, K. A., Sorensen, M. A., Elf, J., Ehrenberg, M. & Pan, T. Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Rep.* **6**, 151–157 (2005).
- Klug, A., Ladner, J. & Robertus, J. D. The structural geometry of co-ordinated base changes in transfer RNA. *J. Mol. Biol.* **89**, 511–516 (1974).
- Kim, S. H. et al. Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**, 435–440 (1974).
- Shi, H. & Moore, P. B. The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited. *RNA* **6**, 1091–1105 (2000).
- Barraud, P. et al. Time-resolved NMR monitoring of tRNA maturation. *Nat. Commun.* **10**, 3373 (2019).
- Chan, C., Pham, P., Dedon, P. C. & Begley, T. J. Lifestyle modifications: coordinating the tRNA epitranscriptome with codon bias to adapt translation during stress responses. *Genome Biol.* **19**, 228 (2018).
- Deng, W. et al. Trm9-catalyzed tRNA modifications regulate global protein expression by codon-biased translation. *PLoS Genet.* **11**, e1005706 (2015).
- Sloan, K. E. et al. Tuning the ribosome: the influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol.* **14**, 1138–1152 (2017).
- Yoon, A. et al. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* **312**, 902–906 (2006).
- Helm, M. & Motorin, Y. Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 275–291 (2017).
- Motorin, Y. & Helm, M. Methods for RNA modification mapping using deep sequencing: established and new emerging technologies. *Genes* **10**, 35 (2019).
- Reichle, V. F., Weber, V. & Kellner, S. NAIL-MS in *E. coli* determines the source and fate of methylation in tRNA. *Chembiochem* **19**, 2575–2583 (2018).
- Reichle, V. F., Petrov, D. P., Weber, V., Jung, K. & Kellner, S. NAIL-MS reveals the repair of 2-methylthiocytidine by AlkB in *E. coli*. *Nat. Commun.* **10**, 5600 (2019).
- Heiss, M., Reichle, V. F. & Kellner, S. Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS. *RNA Biol.* **14**, 1260–1268 (2017).
- Boccaletto, P. et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, D303–D307 (2018).
- Tuorto, F. et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 900–905 (2012).
- Blobstein, S. H., Grunberger, D., Weinstein, I. B. & Nakanishi, K. Isolation and structure determination of the fluorescent base from bovine liver phenylalanine transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **12**, 188–193 (1973).
- Perche-Letuvee, P., Molle, T., Forouhar, F., Mulliez, E. & Atta, M. Wybutosine biosynthesis: structural and mechanistic overview. *RNA Biol.* **11**, 1508–1518 (2014).
- Macon, J. B. & Wolfenden, R. 1-Methyladenosine. Dimroth rearrangement and reversible reduction. *Biochemistry* **7**, 3453–3458 (1968).
- Reichle, V. F. et al. Surpassing limits of static RNA modification analysis with dynamic NAIL-MS. *Methods* **156**, 91–101 (2019).
- Jensen, K. F., Dandanell, G., Hove-Jensen, B. & Willemoes, M. Nucleotides, nucleosides, and nucleobases. *EcoSal Plus* **3**, 3.6.2 (2018).
- Motorin, Y. & Helm, M. tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* **49**, 4934–4944 (2010).
- Kim, S. H. et al. The general structure of transfer RNA molecules. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **71**, 4970–4974 (1974).
- Ashraf, S. S. et al. Role of modified nucleosides of yeast tRNA(Phe) in ribosomal binding. *Cell Biochem. Biophys.* **33**, 241–252 (2000).
- Han, L., Guy, M. P., Kon, Y. & Phizicky, E. M. Lack of 2'-O-methylation in the tRNA anticodon loop of two phylogenetically distant yeast species activates the general amino acid control pathway. *PLoS Genet.* **14**, e1007288 (2018).
- Kos, M. & Tollervey, D. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol. Cell* **37**, 809–820 (2010).
- Heiss, M. & Reichle, V. F. & Kellner, S. Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS. *RNA Biol.* **14**, 1–9 (2017).
- Reichle, V. F. et al. Surpassing limits of static RNA modification analysis with dynamic NAIL-MS. *Methods* **156**, 91–101 (2018).
- Miller, B. G. The biological half-lives of ribosomal and transfer RNA in the mouse uterus. *J. Endocrinol.* **59**, 81–85 (1973).
- Chen, Z. et al. Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs. *Nucleic Acids Res.* **47**, 2533–2545 (2019).
- Ueda, Y. et al. AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells. *Sci. Rep.* **7**, 42271 (2017).
- Legrand, C. et al. Statistically robust methylation calling for whole-transcriptome bisulfite sequencing reveals distinct methylation patterns for mouse RNAs. *Genome Res.* **27**, 1589–1596 (2017).
- Rahimov, R. et al. 5-Formyl- and 5-carboxydeoxycytidines do not cause accumulation of harmful repair intermediates in stem cells. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 10359–10364 (2017).
- Chionh, Y. H. et al. A multidimensional platform for the purification of non-coding RNA species. *Nucleic Acids Res.* **41**, e168 (2013).
- Galvanin, A. et al. Diversity and heterogeneity of extracellular RNA in human plasma. *Biochimie* **164**, 22–36 (2019).

## Acknowledgements

This study was funded through the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KE1943/3-1). M.H., F.H., and S.K. thank Angie Kirchner, Thomas Carell and his group for instrument time (high-resolution mass spectrometer) and advice.

### Author contributions

M.H. and S.K. planned the experiments and wrote the manuscript. M.H., V.M., and F.H. conducted the experiments. M.H., Y.M., and S.K. performed data analysis.

### Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20576-4>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to S.K.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Guifang Jia and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021





# Surpassing limits of static RNA modification analysis with dynamic NAIL-MS

Valentin F. Reichle, Steffen Kaiser, Matthias Heiss, Felix Hagelskamp, Kayla Borland, Stefanie Kellner\*

LMU Munich, Faculty of Chemistry and Pharmacy, Department of Organic Chemistry, Butenandstr. 5, 81377 Munich, Germany

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Epitranscriptome  
tRNA modification  
LC-MS/MS  
Nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry (NAIL-MS)  
tRNA damage repair  
Demethylation

## ABSTRACT

Ribonucleic acids (RNA) are extensively modified. These modifications are quantified by mass spectrometry (LC-MS/MS) to determine the abundance of a modification under certain conditions or in various genetic backgrounds. With LC-MS/MS the steady state of modifications is determined, and thus we only have a static view of the dynamics of RNA modifications. With nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry (NAIL-MS) we overcome this limitation and get access to the dynamics of RNA modifications. We describe labeling techniques for *E. coli*, *S. cerevisiae* and human cell culture and the current instrumental limitations. We present the power of NAIL-MS but we also outline validation experiments, which are necessary for correct data interpretation.

As an example, we apply NAIL-MS to study the demethylation of adenine and cytidine, which are methylated by the damaging agent methyl-methanesulfonate in *E. coli*. With NAIL-MS we exclude the concurrent processes for removal of RNA methylation, namely RNA degradation, turnover and dilution. We use our tool to study the speed and efficiency of 1-methyladenosine and 3-methylcytidine demethylation.

We further outline current limitations of NAIL-MS but also potential future uses for e.g. relative quantification of tRNA isoacceptor abundances.

## 1. Introduction

### 1.1. State-of-the-art quantification of modified nucleosides

Ribonucleic acids (RNA) are key players in the central dogma of molecular biology. Messenger RNA (mRNA), ribosomal RNA (rRNA) and transfer RNA (tRNA) participate in protein synthesis, while the group of non-coding RNAs (ncRNAs) are crucial for many processes, including gene regulation as interfering RNAs (miRNAs) and guide RNAs. As RNAs fulfill many important and diverse functions, more than 4 building blocks are needed. Therefore, a large chemical diversity of ribonucleoside modifications can be found [1]. The chemical alterations of the canonical RNA nucleosides are comprised of simple methylations, isomerization, thiolation or even addition of complex groups like amino acids. Modifications that occur on the base are usually indicated by a small letter (e.g. m- for methylation or s- for thiolation) before calling the base (C, U, G or A). The position on the base is inserted as superscript between the short abbreviation and the base; e.g. 5-methylcytidine is abbreviated as m<sup>5</sup>C. Some modifications, like the hypermodification queuosine, are abbreviated with their own capital letter, e.g. Q. Specific enzymes insert RNA modifications post-transcriptionally.

Studies of modified RNA rely on sensitive detection of modified nucleosides, which is commonly done with triple quadrupole mass spectrometry (described in various reviews [2–4]). The principle and workflow of such analyses is shown in Fig. 1a. After purification of the RNA of interest (here tRNA), the RNA is enzymatically digested into nucleosides and ideally an internal standard is added. The sample is injected on the LC-MS/MS system where the nucleosides are separated chromatographically and their mass transitions are monitored in the mass spectrometer. Using calibration curves, the absolute quantity of each nucleoside can be calculated and the number of modification per tRNA can be plotted.

### 1.2. Nucleic acid isotope labeling (NAIL)

Key to the quantification of nucleosides by mass spectrometry is the availability of the synthetic nucleoside in weighable quantities (or a known extinction coefficient) and an internal standard. The internal standard is ideally an isotopomer of the nucleoside of interest. While the natural nucleoside contains regular isotopes like hydrogen (H) carbon-12 (<sup>12</sup>C), nitrogen-14 (<sup>14</sup>N) its isotopomer will contain one or more heavy isotopes like deuterium (D), carbon-13 (<sup>13</sup>C) or nitrogen-15 (<sup>15</sup>N). The isotopomer is therefore heavier than the natural nucleoside

\* Corresponding author.

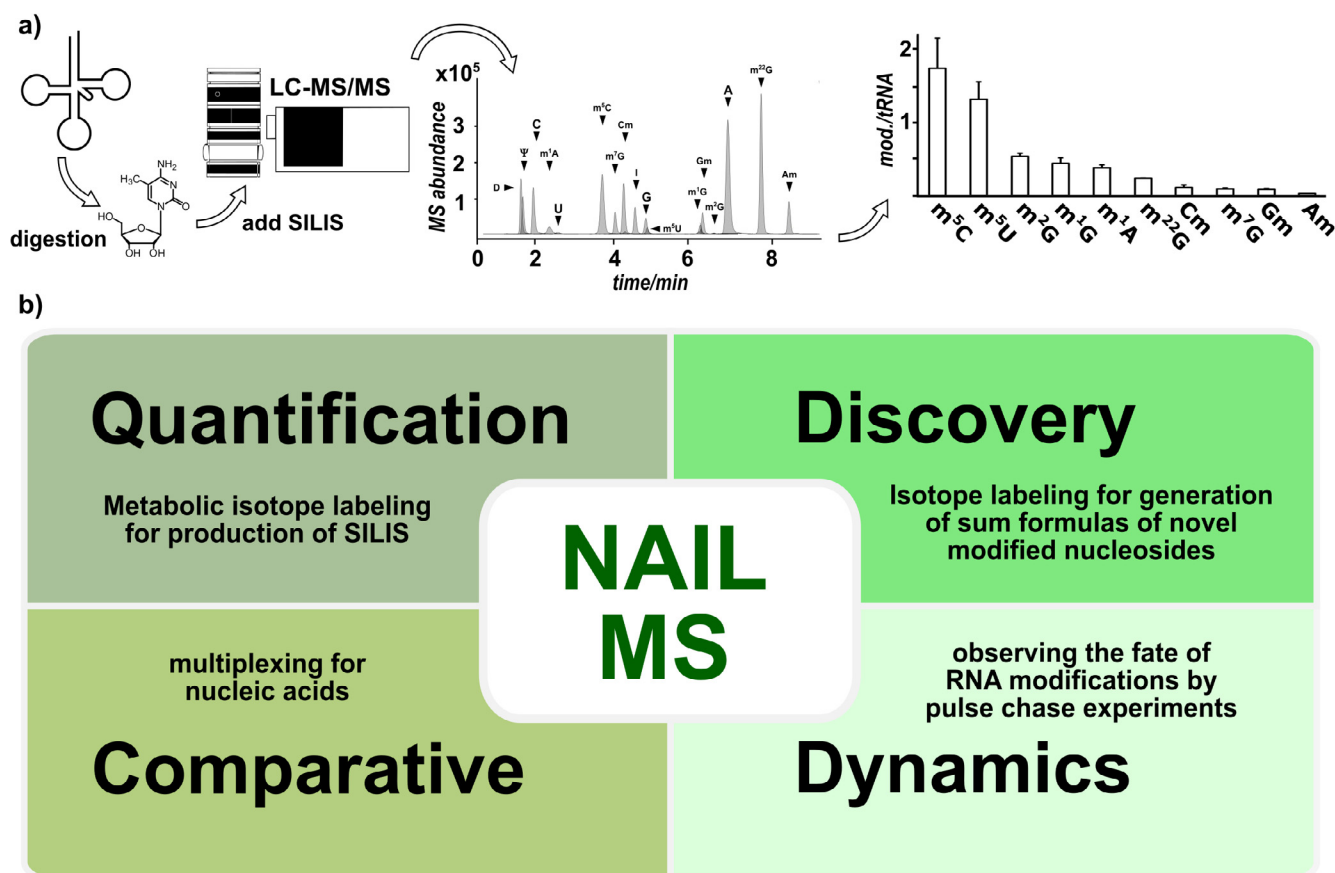
E-mail address: [stefanie.kellner@cup.lmu.de](mailto:stefanie.kellner@cup.lmu.de) (S. Kellner).

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.10.025>

Received 1 August 2018; Received in revised form 25 October 2018; Accepted 31 October 2018

Available online 03 November 2018

1046-2023/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



**Fig. 1. a** General workflow for quantification of modified nucleosides. The RNA is isolated and digested to the nucleoside building blocks (here, 5-methylcytidine). The stable isotope label internal standard (SILIS) is added and the sample is subjected to LC-MS/MS analysis. After chromatographic separation, the nucleosides are detected in the mass spectrometer and the abundance can be calculated and plotted. **b** Current and potential uses of NAIL-MS (nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry).

and it can be used as an internal standard in mass spectrometry. Such internal standards are referred to as stable isotope labeled internal standards (SILIS) and the technique as isotope dilution mass spectrometry. The generation of these isotopomers can be done either synthetically [5–7] or biosynthetically by metabolic labeling in bacteria, yeast or algae [8–10].

Metabolic labeling relies on the incorporation of heavy isotopes from heavy-labeled growth media into the RNA. The heavy labeled RNA is isolated and processed for preparation of a SILIS for quantification. The usage of SILIS reduces the detection fluctuations of the mass spectrometer and thus reliable quantitative data becomes available to study RNA modifications.

However, nucleic acid isotope labeling (NAIL) should not be limited to quantification purposes. One can envision the use in a variety of experiments, which are or will become valuable tools in the research of modified nucleosides. Fig. 1b reviews the current usage of NAIL and potential future uses in RNA modification analysis. In addition to the usage of NAIL in **quantification**, its use to facilitate the **discovery** of novel modified nucleosides is widespread. Here, isotope labeling has become a key tool for sum formula generation and is highly helpful for structure prediction and verification [11–14].

### 1.2.1. Comparative NAIL

One of the caveats in the area of RNA modification research is the lack of key technologies comparable to those boosting protein research [15,16]. In the field of proteomics, a variety of mass spectrometry tools have emerged and allowed scientists to study proteins and their networks in more detail. Many of these tools focus on the comparison of proteomes (all proteins within a cell) in the context of stress studies or

functional analyses by, e.g. multiplexing. Multiplexing allows the direct comparison of samples by mixing them within a single tube and performing a single analysis. They can be distinguished by mass spectrometry either by a chemical labeling step prior to mixing or by metabolic isotope labeling during sample generation. Especially metabolic isotope labeling has the advantage of overcoming purification biases. Additionally, mass spectrometric detection fluctuations are of no consequence. Metabolic isotope labeled proteomics (SILAC-Proteomics [17]) allows a direct comparison of proteomes within a single measurement with high accuracy. In principle, SILAC-like multiplexing is possible by NAIL, and we see a significant potential in such a SILAC-like approach in RNA modification research. We refer to this technique as **comparative NAIL**, which is also a useful tool for validation of dynamic NAIL-MS experiments.

### 1.2.2. Dynamic NAIL

While epigenetics is an intensively studied area, the analogue process in RNA, termed epitranscriptomics, is far less studied. This is mainly caused by our limited number of tools to study the dynamics of RNA modifications and, in addition, the complex process of finding biological consequences to RNA modifications. DNA is the storage of the genetic code. Therefore, modifications of DNA must be removed by an enzymatic process, which leaves the DNA sequence untouched and the DNA intact. Otherwise, mutations would occur and harm the organism. While it should be possible for the cell to use similar removal mechanisms in RNA, RNA has a second option for removal of an unwanted modification – the whole RNA itself is degraded and an unmodified new RNA is transcribed. The potential competition between these two processes makes it difficult to study the dynamics of RNA

modifications. Although many studies described that mRNA is enzymatically demodified, the mechanisms are still reviewed skeptically [18]. These doubts arise from the used techniques for *in vivo* analysis of the demodification process. In these studies, quantitative mass spectrometry of RNA modifications was used to observe an active demodification *in vivo* [19]. However, the absolute number of a modification within an RNA does not reflect the origin of the modification. A decrease in modification density can be explained by enzymatic demodification processes but also by increased degradation of modified RNA or even by increased transcription of unmodified RNA. *Vice versa*, an increase in modification density can be explained by additional modification events in the original RNA or by increased degradation of non-modified RNAs.

Current analyses of nucleic acid modifications are limited in respect to their blindness towards the underlying mechanisms, which lead to changes of modification content. NAIL-MS expands our current analytical toolbox and overcomes limitations by providing insight into the dynamics of nucleic acid modifications.

### 1.3. Nucleic acid isotope labeling as a tool to observe nucleic acid modification dynamics

From the natural RNA modifications known to date (~160), 70 contain a methylation of the base or the ribose [1]. These methylations are enzymatically incorporated at defined positions of the RNA. Especially m<sup>6</sup>A in mRNA has gained major interest since this is the first RNA modification, which is incorporated by a methyltransferase (writer) and can be removed by demethylation via FTO or AlkBH5 (erasers).

In yeast, it was found that tRNA modifications are highly dynamic during cellular stress and are used by the cell for efficient stress survival by changing the translational speed of stress response proteins [20]. Although the dynamic nature of tRNA modifications is crucial to cell survival, it remains unclear how the cell achieves the adaptation of the modification profile. Additionally, cells are facing various stressors that can actively methylate the RNA such as methyl-methanesulfonate (MMS). Such methylations are randomly distributed across the accessible sites in RNA. *In vitro* tests showed that methylation of positions 1 of adenine and 3 of cytosine are quickly repaired by AlkB in *E. coli* [21].

Only one study showed the repair of m<sup>1</sup>A by AlkB *in vivo*. This early pulse-chase study, based on radioactively labeled adenine, showed removal of m<sup>1</sup>A from MMS damaged RNA by AlkB *in vivo*. Other studies that report demethylation processes in RNA did not present clear *in vivo* evidence of demethylation due to the limitations of static LC-MS/MS quantification.

Our first steps to overcome this limitation was in 2017, when we utilized non-radioactive isotope labeling of DNA to observe damage and repair of a DNA modification in bacteria. The combination of different labeling media allowed the creation of a pulse-chase experiment, which was used to observe repair of phosphorothioates in bacterial DNA [22]. The principle is shown in Fig. 2a. The bacteria were pre-cultured in heavy labeled media resulting in complete heavy labeling of the DNA nucleosides. In the heavy media, the bacteria were exposed to hypochlorous acid and the DNA present at this moment was damaged. After the exposure the bacteria were placed into unlabeled media and replication produced unlabeled DNA. By this approach it was possible to distinguish DNA present during the exposure from DNA synthesized after the exposure by mass spectrometry. Thus, we could see the loss of original phosphorothioates upon reaction with the chemical *in vivo* and the subsequent repair by the phosphorothiolating dnd enzymes. In the same year, we adapted the approach to RNA modification analysis in yeast [9]. As shown in Fig. 2b, we followed the modification density of tRNA in dependence of the growth phase and we identified the underlying mechanisms for several modified nucleosides (here 7-methylguanosine, m<sup>7</sup>G, is shown). With NAIL-MS we can assess RNA turnover, RNA biosynthesis and dilution effects and determine the modification content of RNAs in response to e.g. growth or stress.

With LC-MS/MS the steady state of modifications is determined and thus is limited to a static view on dynamic RNA modification processes. Here, we present nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry (NAIL-MS) which overcomes these current limitations and allows dynamic analysis of RNA modifications. We describe labeling techniques for *E. coli*, *S. cerevisiae* and human cell culture and the current instrumental limitations and recommended validation experiments.

We apply NAIL-MS to study the repair of adenine and cytidine, which are methylated by the damaging agent MMS in *E. coli*. With NAIL-MS, we exclude the concurrent processes for removal of RNA methylation, namely RNA degradation, turnover and dilution. The power of NAIL-MS is demonstrated by showing the kinetics of demethylation of damage-derived 1-methyladenosine and 3-methylcytidine in *E. coli in vivo*. We further outline current limitations of NAIL-MS but also potential future uses for e.g. relative quantification of RNA abundances.

## 2. Material and methods

### 2.1. Salts, reagents, isotopes and nucleosides

All salts were obtained from Sigma Aldrich (Munich, Germany) at molecular biology grade unless stated otherwise. Isotopically labeled compounds: <sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub>Cl (≥98% atom) and L-methionine-methyl-D<sub>3</sub> (98% atom) from Sigma-Aldrich. <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose (≥99% atom) and Na<sub>2</sub><sup>34</sup>SO<sub>4</sub> (≥99.1% atom) from Eurisotop (Saarbruecken, Germany). 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uracil (98% atom) from Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA). All solutions and buffers were made with water from a Millipore device (Milli-Q, Merck). Nucleosides: adenosine (A), cytidine (C), guanosine (G), uridine (U) and N2-methylguanosine (m<sup>2</sup>G) from Sigma Aldrich. 1-Methyladenosine (m<sup>1</sup>A), 2-methyladenosine (m<sup>2</sup>A), N3-methylcytidine (m<sup>3</sup>C), N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A), 7-methylguanosine (m<sup>7</sup>G), 5-methylcytidine (m<sup>5</sup>C), 5-methyluridine (m<sup>5</sup>U), 2'-O-methylcytidine (Cm), 2'-O-methylguanosine (Gm), 1-methylguanosine (m<sup>1</sup>G) and 3-methyluridine (m<sup>3</sup>U) from Carbosynth (Newbury, UK).

### 2.2. Specific laboratory equipment

Injection vial for HPLC and LC-MS: 0.3 mL PP Snap Ring Micro Vial, 32 × 11.6 mm, transparent, VWR (Radnor, PA, USA), Cat. No. 548-0120.

Injection vial cap: 11 mm Snap Ring Cap, tr., natural rubber/TEF, 60°, 1.0 mm, VWR (Radnor, PA, USA), Cat. No. 548-0014.

Fraction Collector glass vial: 1.5 mL Screw vial, 32 × 11.6 mm clear, VWR (Radnor, PA, USA), Cat. No. VWRI548-0018.

Glass vial cap: 8 mm PP-Screw cap black hole, VWR (Radnor, PA, USA), Cat. No. VWRI548-3322.

Culture tube: Centrifuge tube 50, TPP (Trasadingen, Switzerland), Product No.91050

### 2.3. Experimental settings

#### 2.3.1. Metabolic isotope labeling

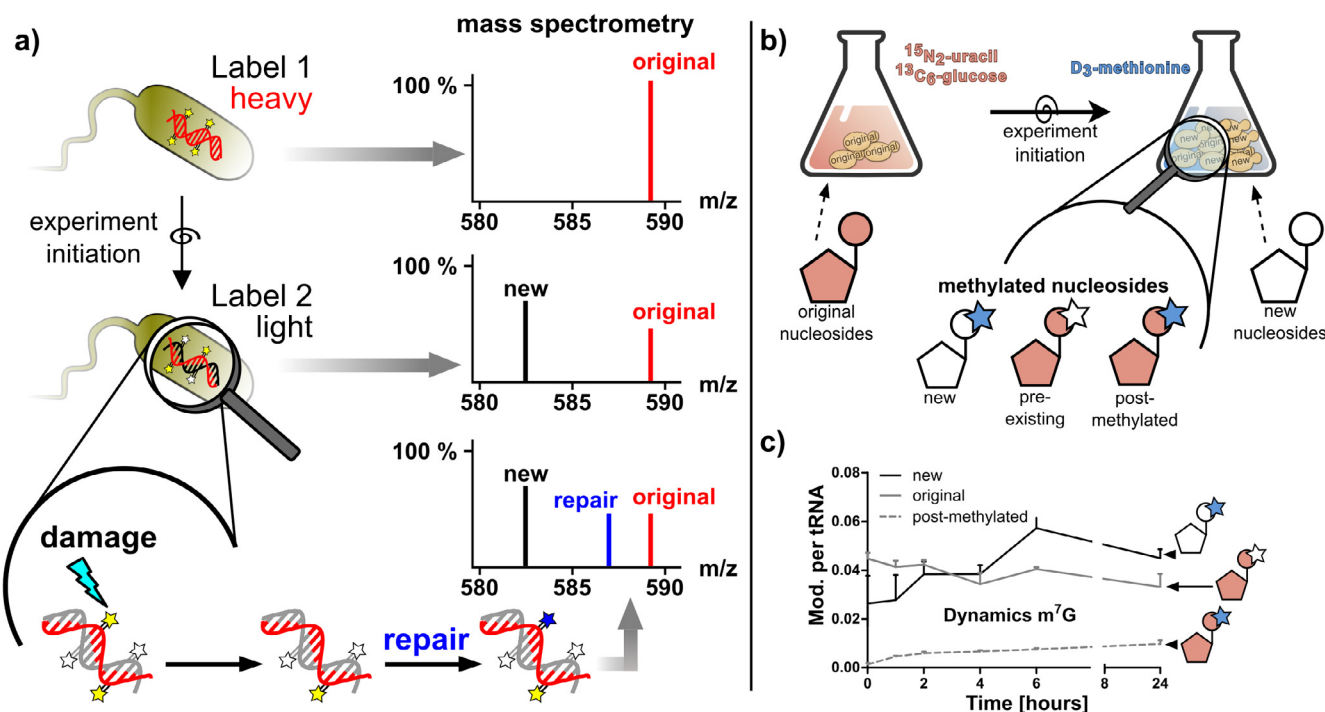
**2.3.1.1. Bacteria.** For each experiment a single colony from an LB agar plate with *E. coli* BW25113 was picked and used for culture inoculation.

We used minimal media M9 with and without the indicated isotopes for all bacterial cultures.

Unlabeled 10 × M9 stock solution: mix 68 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 g/L NaCl and 10 g/L NH<sub>4</sub>Cl and autoclave. Store at room temperature.

Nitrogen-15-labeled 10x M9 stock solution: mix 68 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 g/L NaCl and (!) 10 g/L <sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub>Cl (!) and autoclave. Store at room temperature.

Other stock solutions: MgCl<sub>2</sub> (0.1 M), CaCl<sub>2</sub> (0.1 M), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1 M) and 20 w/w% glucose (or <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose) are prepared by sterile



**Fig. 2.** **a** Principle of a NAIL-MS assay, which allows the observation of DNA modification damage repair *in vivo*. The bacteria are cultured in heavy isotope containing media, and therefore the DNA is heavy labeled, as observed by mass spectrometry. After exposure to the damage, the media is exchanged to a light media and newly replicated DNA is light labeled. The repair of original, but damaged DNA is observed by the formation of an intermediately labeled species in the mass spectrometer. (Adapted from [22].) **b** Principle of a dynamic NAIL-MS assay of tRNA in *S. cerevisiae* and the dynamics of 7-methylguanosine (m<sup>7</sup>G) in tRNAs after experiment initiation. The drop in pre-existing m<sup>7</sup>G is masked by an increase of post-methylated m<sup>7</sup>G added to the pre-existing tRNAs (from [9]).

#### filtration.

For an unlabeled 5 mL pre-culture (or 50 mL exposure culture, respectively) mix 500  $\mu\text{L}$  (5 mL) 10x M9 stock solution with 100  $\mu\text{L}$  (1 mL) glucose, 100  $\mu\text{L}$  (1 mL)  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{L}$  (1 mL)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and 5  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{L}$ )  $\text{CaCl}_2$ .

For  $^{13}\text{C}$ -labeled cultures,  $^{13}\text{C}_6$ -glucose was used.

For  $^{15}\text{N}$ -labeled cultures, the  $^{15}\text{N}$ -10x M9 stock solution was used.

For CD<sub>3</sub>-labeling, 200  $\mu\text{L}$  of L-methionine-methyl-D<sub>3</sub> (stock 5 g/L) were added to 5 mL of culture volume.

**2.3.1.2. Yeast.** A single colony of a *S. cerevisiae* BY4741 YPD agar plate was picked and used for inoculation of 5 mL YNB media. 10x YNB (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) was prepared according to manufacturer's manual. 1x YNB media was supplemented with the following metabolites to a final concentration of: 10 g/L glucose, 0.02 g/L uracil, 0.02 g/L methionine, 0.02 g/L arginine, 0.1 g/L aspartic acid, 0.1 g/L glutamine, 0.02 g/L histidine, 0.06 g/L leucine, 0.03 g/L lysine, 0.05 g/L phenylalanine, 0.4 g/L serine, 0.2 g/L threonine, 0.04 g/L tryptophan, 0.03 g/L tyrosine and 0.15 g/L valine (only L-amino acids were used). Depending on the desired labeling,  $^{13}\text{C}_6$ -glucose and L-methionine-methyl-D<sub>3</sub> were used instead of the unlabeled compounds.

**2.3.1.3. Mammalian cells.** HEK 293 T cells were cultured in Dulbeccó's Modified Eagle Media (DMEM) or RPMI 1640 media (Gibco, Carlsbad, CA, USA). DMEM media was prepared by dissolving 8.4 g DMEM powder D5030 (Sigma Aldrich) in 1 L milli-Q water. Before sterile filtration, carbonate and phenol red were added to a final concentration of 3.7 g/L  $\text{NaHCO}_3$  and 0.0159 g/L phenol red. Stocks of glucose (200 g/L) and L-glutamine (15 g/L) were prepared and sterile filtered. These were added to the DMEM media before usage to a final concentration of 2 g/L glucose, 0.584 g/L L-glutamine and 10% dialyzed fetal calf serum (Sigma Aldrich, Product No. F0392-500ML). The methionine concentration was 0.15 g/L in the final media.

Depending on the desired labeling either  $^{13}\text{C}_6$ -glucose and L-methionine-methyl-D<sub>3</sub> or their unlabeled isotopomers were used. The cells were incubated at 10%  $\text{CO}_2$  atmosphere and cultivated in the labeled media for at least 2 days (5 days for complete labeling). For splitting, the cells were treated with TrypLE Express (Gibco, Carlsbad, CA, USA).

#### 2.3.2. RNA isolation and tRNA purification

Bacteria cultures were centrifuged at  $1200 \times g$  for 5 min, yeast cultures at  $3500 \times g$  for 5 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in 1 mL TRI-Reagent® (Sigma-Aldrich) per 5 mL culture, respectively. Yeast cells were additionally vortexed for 5 min using acid-washed Glass beads (Sigma-Aldrich) equivalent to  $\sim 200 \mu\text{L}$ . HEK cells were harvested directly in cell culture dishes/flasks using 1 mL TRI-Reagent® per  $25 \text{ cm}^2$ . After transfer into an Eppendorf tube and incubation at room temperature for 5 min, 200  $\mu\text{L}$  of chloroform ( $\geq 99\%$  purity, Roth) were added to 1 mL of the TRI-Reagent® solution of each organism and the mixture was vortexed for at least 10 s. The biphasic solution was allowed to settle at room temperature for 5 min and centrifuged at room temperature for 20 min at  $10,000 \times g$ . The clear upper phase ( $\sim 500 \mu\text{L}$ ) was transferred into a new vial, 500  $\mu\text{L}$  of isopropanol (Roth, Karlsruhe, Germany) were added and the solution was mixed thoroughly. The mixture was stored at  $-20^\circ\text{C}$  overnight. The precipitated total RNA was pelleted by centrifugation for 40 min at  $12,000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$ . The RNA pellet was washed two times with 100–200  $\mu\text{L}$  70% EtOH and finally dissolved in 30  $\mu\text{L}$  water.

For purification of tRNA from total RNA size exclusion chromatography (SEC) [23] was used on an Agilent 1100 HPLC system (Degasser, G1279A; Quat Pump, G1311A; ALS, G1313A; COLCOM, G1316A; VWD, G1314A; Analyst FC, G1364C) with an AdvanceBio column, 300 Å pore size, 2.7  $\mu\text{m}$  particle size,  $7.8 \times 300 \text{ mm}$  (Agilent, Waldbronn, Germany). For elution, a 1 mL/min isocratic flow of 0.1 M ammonium acetate was used. Eluting RNA was detected at 254 nm with a diode array detector. Under these conditions, tRNA elutes at a retention time



between 7 and 8 min. The 1 mL tRNA fraction was collected and evaporated (GeneVac, EZ-2 PLUS, Ipswich, UK) to a volume of ~100 µL before precipitation by addition of 0.1 vol of 5 M ammonium acetate and 2.5 vol of ice-cold ethanol (100%). (!) Ammonium acetate is the precipitation method of choice if mass spectrometric analysis is desired. Sodium ions interfere with mass spectrometric detection of nucleosides and should be avoided if possible (!) After rigorous mixing, the tRNA was allowed to precipitate at –20 °C overnight. The tRNA was pelleted by centrifugation (12,000g, 40 min, 4 °C), washed with 70% ethanol and resuspended in 30 µL water.

### 2.3.3. Pulse-Chase NAIL-MS

A single *E. coli* colony was picked and grown in 5 mL unlabeled M9 media overnight (37 °C, shaking at 250 rpm). From this pre-culture, a second overnight culture was prepared by inoculating 50 mL unlabeled media with the complete 5 mL pre-culture. On the next day, these bacteria were added to 120 mL of unlabeled M9 media to a final OD of 1.0. After 60 min of growth at 37 °C and 250 rpm, the first 7 mL aliquot was taken for RNA isolation. The remaining culture was equally split in 2 Erlenmeyer flasks (100 mL glass size) of 56.5 mL each. One was exposed to 95.7 µL MMS (99% purity), the other to the same amount of water (MOCK) and gently stirred before both cultures were left to grow for 60 min at 37 °C with shaking at 250 rpm. After 60 min exposure, an aliquot of 7 mL was drawn from each culture and the RNA was isolated. The remaining bacteria were centrifuged (1200×g, 5 min) and the MMS/MOCK containing supernatants were discarded. The bacteria pellets were washed with 5 mL <sup>15</sup>N/CD<sub>3</sub>-methionine labeled M9 media and each suspended in 50 mL fresh <sup>15</sup>N/CD<sub>3</sub>-methionine M9 media. For recovery, the bacteria were grown at 37 °C, 250 rpm and after 1, 2, 3, 4 and 10 h 7 mL aliquots were drawn for RNA isolation.

### 2.3.4. tRNA digestion for mass spectrometry

100 ng tRNA in 30 µL aqueous digestion mix were digested to single nucleosides by using Alkaline Phosphatase (0.2 U, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), Phosphodiesterase I (0.02 U, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) and Benzonase (0.2 U Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in Tris (5 mM, pH 8.0) and MgCl<sub>2</sub> (1 mM) containing buffer. Furthermore, tetrahydrouridine (THU, 0.5 µg from Merck), butylated hydroxytoluene (BHT, 1 µM, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and Pentostatin (0.1 µg, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) were added to avoid deamination and oxidation of nucleosides [2]. All mentioned concentrations/amounts are final concentrations/amounts used in a 30 µL final digestion volume. The mixture was incubated with the RNA for 2 h at 37 °C and filtered through 96 well filterplates (AcroPrep™ Advance 350 10 K Omega™, PALL Corporation, New York, USA) at 4 °C for 30 min at 3000×g, or through single tubes (VWR, 10 kDa MWCO) at room temperature for 7 min at 5000×g. The filtrate was mixed with *E. coli* SILIS 10:1 (stable isotope labeled internal standard [8]) and measured with the triple quadrupole mass spectrometer.

## 2.4. LC-MS instruments and methods

### 2.4.1. Triple quadrupole instrument

For quantification an Agilent 1290 Infinity II equipped with a DAD combined with an Agilent Technologies G6470A Triple Quad system and electro-spray ionization (ESI-MS, Agilent Jetstream) was used. Optimized operating parameters: positive ion mode, skimmer voltage 15 V, Cell Accelerator Voltage 5 V, N<sub>2</sub> gas temperature 230 °C and N<sub>2</sub> gas flow 6 L/min, sheath gas (N<sub>2</sub>) temperature 400 °C with a flow of 12 L/min, Capillary Voltage of 2500 V, Nozzle Voltage of 0 V and the Nebulizer at 40 psi. The instrument was operated in dynamic MRM mode and the individual mass spectrometric parameters for the nucleosides are given in [Supplementary Tables S2 and S3](#). Mobile phase A was 5 mM NH<sub>4</sub>OAc (≥99%, HiPerSolv CHROMANORM®, VWR), brought to pH = 5.3 with glacial acetic acid (≥99%, HiPerSolv CHROMANORM®, VWR). Mobile phase B was pure acetonitrile (Roth, LC-

MS grade, purity ≥99.95). A Kinetex EVO column (Phenomenex®, Torrance, California, USA; Kinetex® 1.7 µm EVO C18 100 Å, 150 × 2.1 mm) at a temperature of 35 °C with an eluent flow rate of 0.35 mL/min was used. The gradient started at 100% solvent A, followed by an increase to 10% solvent B over 10 min. From 10 to 15 min solvent B was increased to 45% and maintained for 3 min before returning to 100% solvent A and a 3 min re-equilibration period. Alternatively, a Synergi Fusion-RP column (Phenomenex®, Torrance, California, USA; Synergi® 2.5 µm Fusion-RP 100 Å, 150 × 2.0 mm) at 35 °C and a flow rate of 0.35 mL/min was used for yeast and mammalian cell analysis. Gradient elution started with 100% A for 1 min, increased to 10% B after 5 min, and to 40% after 7 min. The column was flushed with 40% B for 1 min. After regeneration of starting condition for 0.5 min the column was re-equilibrated at 100% A for 3 additional minutes.

### 2.4.2. High-resolution mass spectrometry

The ribonucleosides were separated using a Dionex Ultimate 3000 HPLC system on an Interchim Uptisphere120-3HDO C18 or an RP-18 column (Synergi, 2.5 µm Fusion-RP C18 100 Å, 100 × 2 mm; Phenomenex®, Torrance, California, USA). Mobile phase A was 2 mM ammonium acetate and mobile phase B was 80% acetonitrile containing 2 mM ammonium acetate. Gradient elution started with 0% B and increased to 12% B after 10 min and to 80% after 12 min. After 4 min elution at 80% B and subsequently regeneration of starting conditions to 100% A after 5 min, the column was equilibrated at 100% A for 8 min. The flow rate was 0.2 mL/min and the column temperature 30 °C. High-resolution mass spectra of precursor and product ions were recorded by a ThermoFinnigan LTQ Orbitrap XL. The parameters of the mass spectrometer were tuned with a freshly mixed solution of adenosine (5 µM). The parameters were sheath gas flow rate, 5 arb; auxiliary gas flow rate, 35 arb; sweep gas flow rate, 0 arb; spray voltage, 5.0 kV; capillary temperature, 200 °C; capillary voltage, 20 V, tube lens 65 V.

## 2.5. Calibration and equations

For calibration, synthetic nucleosides were weighed and dissolved to a stock concentration of 1–10 mM. Calibration solutions ranging from 0.15 pmol to 500 pmol for each canonical nucleoside and from 0.15 fmol to 500 fmol for each modified nucleoside were prepared in water. The calibration solutions were mixed with the *E. coli* SILIS and analyzed with the appropriate method. The value of each integrated peak area of the nucleoside was divided through the respective SILIS area. The linear regression for each nucleoside's normalized signal/concentration plot gives the relative response factor for nucleosides (rRFN) [8]. The sample data were analyzed by the Quantitative and Qualitative MassHunter Software from Agilent. The areas of the nucleoside signals were integrated for each modification and their isotope derivatives. The area was divided through the respective SILIS area and divided through the rRFN value from the respective calibration to receive the absolute amount of the modification or canonical. Finally, the absolute amounts of the modifications were referenced to the absolute amounts of the precursor canonical. In case of the validation and dynamic NAIL-MS experiment the different isotopomers were referenced to their respective labeled canonicals, so that original modifications are referenced to original canonicals and new modifications were referenced to new canonicals. See the following equations for m<sup>1</sup>A as an example:

	m <sup>1</sup> A (fmol)	A (fmol)	Normalization
Original	$\frac{\text{area } m^1A \text{ (unlabeled)}}{\text{RFN } m^1A \times \text{area } m^1A \text{ (SILIS)}}$	$\frac{\text{area } A \text{ (unlabeled)}}{\text{RFN } A \times \text{area } A \text{ (SILIS)}}$	$\frac{m^1A \text{ (original)}}{A \text{ (original)}}$
Here: unlabeled			

New	area m1A (labeled)	area A (labeled)	m1A (new)
Here: labeled	$\frac{RFN}{m1A \times area} \frac{m1A}{(SILIS)}$	$\frac{RFN}{A \times area} \frac{A}{(SILIS)}$	$\frac{m1A}{A} \frac{(new)}{(new)}$

## 2.6. Other instruments

Orbital Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Riga, Latvia); Rotina 380 R centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany); Centrifuge 5427 R (Eppendorf, Hamburg, Germany); Perfect Spin 24 R refrigerated micro centrifuge (PeQlab/VWR, Erlangen, Germany); Vortexer (Heathrow Scientific, IL, USA), Product Code: 120212; Nanophotometer N60 Touch (Implen, Munich, Germany), T60966; Speedvac EZ-2<sup>PLUS</sup> (GeneVac, Ipswich, UK).

## 3. Important considerations for NAIL-MS studies

As the term NAIL-MS states, there are two key features for setting up such studies. The first is defined isotope labeling of the nucleic acid (NAIL) and the second is the availability of a mass spectrometer (MS). In addition, we recommend rigorous validation of NAIL-MS studies, which will be discussed in detail.

### 3.1. Labeling techniques

Before starting a NAIL-MS experiment, a labeling technique must be established, which leads to a defined labeling of the nucleic acid. Microorganisms like *E. coli* [8] and *S. cerevisiae* [9] are effortlessly labeled in minimal media or complete media (e.g. from Silantes, Munich, Germany). In addition, algae like *Chlamydomonas reinhardtii* or worms such as *Caenorhabditis elegans* can be labeled [10,24]. Fig. 3a shows the mass spectra of digested tRNA from an *E. coli* culture in minimal media M9 using <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose as the carbon source (left) or using CD<sub>3</sub>-methionine (right). By feeding <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose overnight, 83% of carbon atoms in the tRNA are <sup>13</sup>C labeled in the exemplary nucleoside guanosine (G). Thus a mass increase of +10 is observed for G compared to unlabeled G (and ~17% of a +9 species). Most enzymatic methylation reactions require S-adenosyl methionine (SAM) as the methyl donor. After the methylation, the resulting S-adenosyl homocysteine is recharged with a methyl group by methionine. Feeding organisms CD<sub>3</sub>-methionine leads to the formation of CD<sub>3</sub>-SAM and transfer of heavy methyl marks onto nucleic acids [25,26]. This is also observed for 7-methylguanosine (m<sup>7</sup>G) from CD<sub>3</sub>-methionine supplemented bacterial cultures, which has a mass increase of +3 compared to unlabeled m<sup>7</sup>G (note: the +4 is the natural <sup>13</sup>C isotope peak of m<sup>7</sup>G). We recently shared this labeling technique, which helped Dal Magro et al. to determine the structure of a novel RNA modification in bacteria, namely msms<sup>216</sup>A [11].

For purines in *S. cerevisiae*, we mainly observe a +6 mass increase upon culturing in <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose media overnight and a +3 for m<sup>7</sup>G in CD<sub>3</sub>-methionine media (Fig. 3b). It is noteworthy that both labeling techniques do not lead to a single defined isotopomer. Further validation is necessary to assess the impact of multiple isotopomer formation (see chapter on validation). In addition to the presented <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose and CD<sub>3</sub>-methionine labeling, it is possible to use <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl or <sup>34</sup>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [22] in *E. coli* or <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uracil in yeast for further labeling options. It is also possible to combine the carbon, nitrogen, sulfur and methyl sources into a single media.

While yeast is already less efficiently labeled in minimal media compared to *E. coli* (compare Fig. 3a and b), labeling in human cell culture is even more difficult. We have tested HEK 293 T and Hela cell lines in both DMEM and RPMI media using <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose and CD<sub>3</sub>-methionine. While labeling of methyl groups with CD<sub>3</sub>-methionine is similarly successful in HEK cells (Fig. 3c) as it is in yeast cells, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose labeling is less promising. We observed for all nucleosides a variety of formed isotopomers, which were found to be independent of the used serum. Culturing for a longer time did not increase labeling

efficiency. Fig. 3c shows the guanosine signal from tRNA of a 5 day-labeled HEK culture in the presence of 2 g/l <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose. Here, a mass shift of +5, +6, +7 and +8 is observed for G. The +5 reflects a guanosine with a <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-labeled ribose but unlabeled base. The +6 to +8 labeled peaks reflect guanosine isotopomers with <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-labeled ribose and <sup>13</sup>C<sub>x</sub>-labeled base. Such a labeling technique is not suitable for comparative NAIL-MS studies (but potentially for dynamic NAIL-MS). <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose appears not to be the metabolite of choice for successful NAIL-MS experiments in cell culture systems. The determination of a metabolite or even a mixture of metabolites, which can be used to achieve a defined labeling in cell culture, is the major bottleneck in establishing NAIL-MS in cell culture.

When choosing a labeling technique for comparative or pulse-chase NAIL-MS, the abundance of natural isotopes, especially <sup>13</sup>C (1.1% rel. abundance) has to be considered. Pyrimidines and purines have 9 and 10 Carbon atoms, respectively. Statistically, ~10% of all nucleosides carry one <sup>13</sup>C atom ( $m/z + 1$ ), 1% carry two <sup>13</sup>C atoms ( $m/z + 2$ ) and 0.1% carry three <sup>13</sup>C atoms ( $m/z + 3$ ). We recommend labeling techniques, which increase the mass by at least 3 Dalton to avoid the detection of the natural <sup>13</sup>C-isotopomers of the nucleosides.

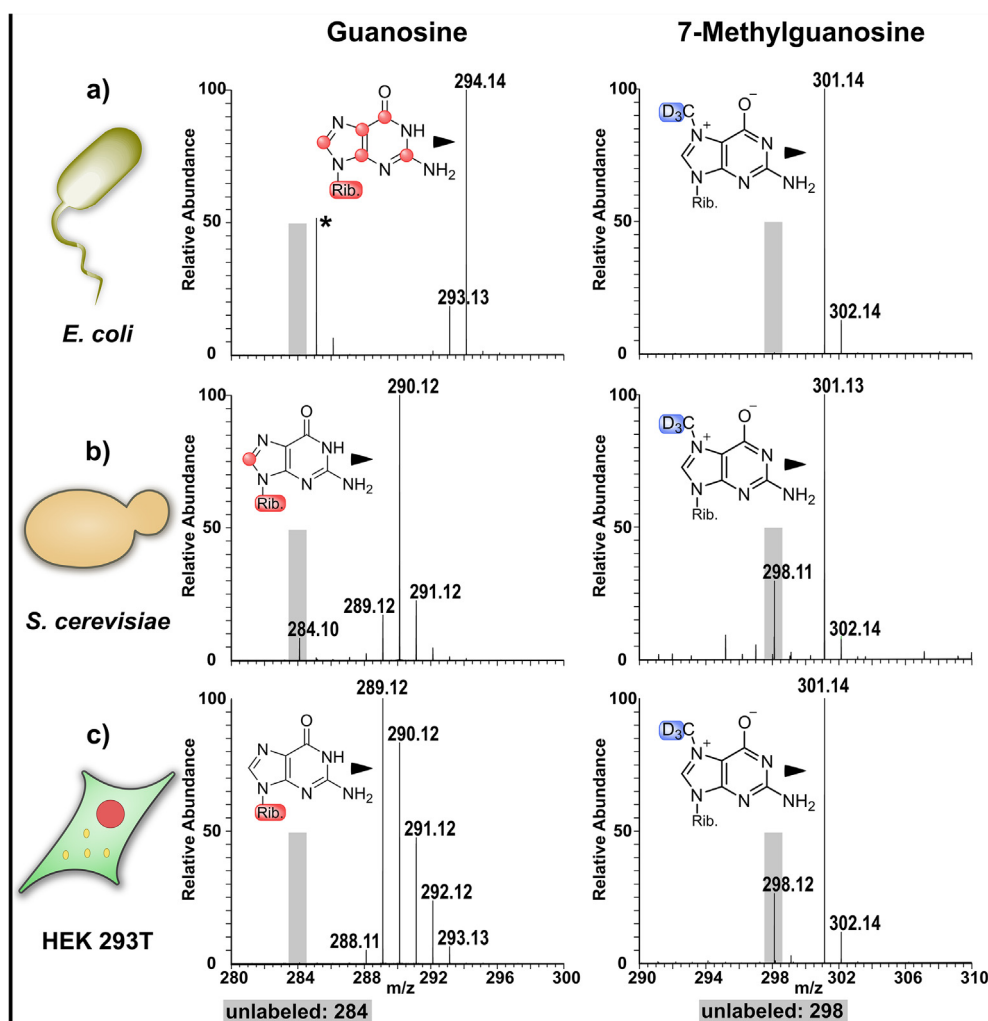
The preparation of isotopically labeled media requires the acquisition of isotopically labeled compounds, which are more expensive than the unlabeled compound. We have summarized the cost of 1 Liter NAIL-MS media in an overview in Table 1. Per NAIL-MS experiment around 20–50 mL heavy labeled media is necessary. The least expensive isotope labeling is achieved in bacteria (76 €/L) and cell culture (290 €/L), but here the labeling efficiency is quite low. Yeast minimal media (945 €/L) labeling is affordable, but yeast complete media (2025 €/L) is the most expensive and therefore solely recommended for the production of internal standards.

### 3.2. Mass spectrometry

For the detection of modified nucleosides, sensitive triple quadrupole instruments are used. The first quadrupole filters for the nucleosides'  $m/z$  values (e.g.  $m/z$  298 for m<sup>7</sup>G). In the collision cell (historically second quadrupole), the nucleoside is fragmented into nucleobase and ribose and the charge remains on the nucleobase. The third quadrupole filters for the nucleobases'  $m/z$  values (e.g.  $m/z$  166 for m<sup>7</sup>G). The detection of product ions from defined precursor ions is called a mass transition. For m<sup>7</sup>G, the mass transition is 298 → 166. Commonly, 20–30 modified nucleosides are analyzed in a single run. This is achieved by fast switching from one nucleoside's mass transition to the next (around every 5–10 ms). If ions from the previous nucleoside remain in the mass spectrometer, although the instrument selects for the next nucleoside, false positive signals can be observed. Especially for co-eluting isotopomers with small differences in mass transitions, carry-over in the collision cell falsifies the detected quantities of the compounds. Linear collision cells with hexapoles and octapoles have high carry-over tendencies and should be validated for usability for NAIL-MS methods. The desired method can be tested by injection of single-labeled samples, which should only produce signals for the isotopomers from the used label. Signals from other isotopomer mass transitions are considered artefacts and the method is not usable for NAIL-MS studies. The carry-over error can be reduced by programming only 1–2 nucleosides into the method or by using time-gated selection of mass transitions. The new generation of QQQ instruments use faster collision cells (curved or T-wave), which have less to no carry-over. Note: Carry-over is rarely a problem in common nucleoside quantification as most nucleosides are chromatographically separated and thus do not disturb each other in the mass spectrometer.

### 3.3. Validation of NAIL-MS experiments

Insufficient labeling and a slow mass spectrometry can result in false positive results or misinterpretation. Thus, NAIL-MS experiments must



**Fig. 3.** High resolution mass spectra from  $^{13}\text{C}$  labeled guanosine and  $\text{CD}_3$ -labeled 7-methylguanosine in *E. coli* (a), *S. cerevisiae* (b) and HEK 293 T (c). The grey bars in the spectra point out the expected  $m/z$  value of the unlabeled compounds. \*Coeluting compound.

**Table 1**

Costs of NAIL-MS suitable media per Liter media in Euro.

Used isotope	$\text{CD}_3$	$^{13}\text{C}$	$^{15}\text{N}$	$^{34}\text{S}$
Bacteria ( <i>E. coli</i> )	17	360	76	510
Yeast minimal	45	945	/	/
Yeast complete	1125	2025	/	/
Human cell culture	123	290	/	/

be carefully validated before they can be used for biological questions. The first step in validation should be to determine the labeling efficiency. As previously mentioned, it is crucial that the labeling leads to only one labeled isotopomer (e.g. 95%  $m/z$  of +5) and not several (e.g. 37%  $m/z$  +5, 31%  $m/z$  +6 and 18%  $m/z$  +7 as seen for guanosine in Fig. 3c). We recommend testing each labeling strategy by scanning the nucleoside mass range (e.g.  $m/z$  240–400) and validate the abundance of all nucleoside isotopomers. If more than one isotopomer is formed under one labeling condition, we recommend optimization of the labeling technique. Sometimes low purity of the isotopically labeled metabolites/salts can also result in labeling inefficiency. In these cases, materials from other suppliers with higher isotope purity should be tested.

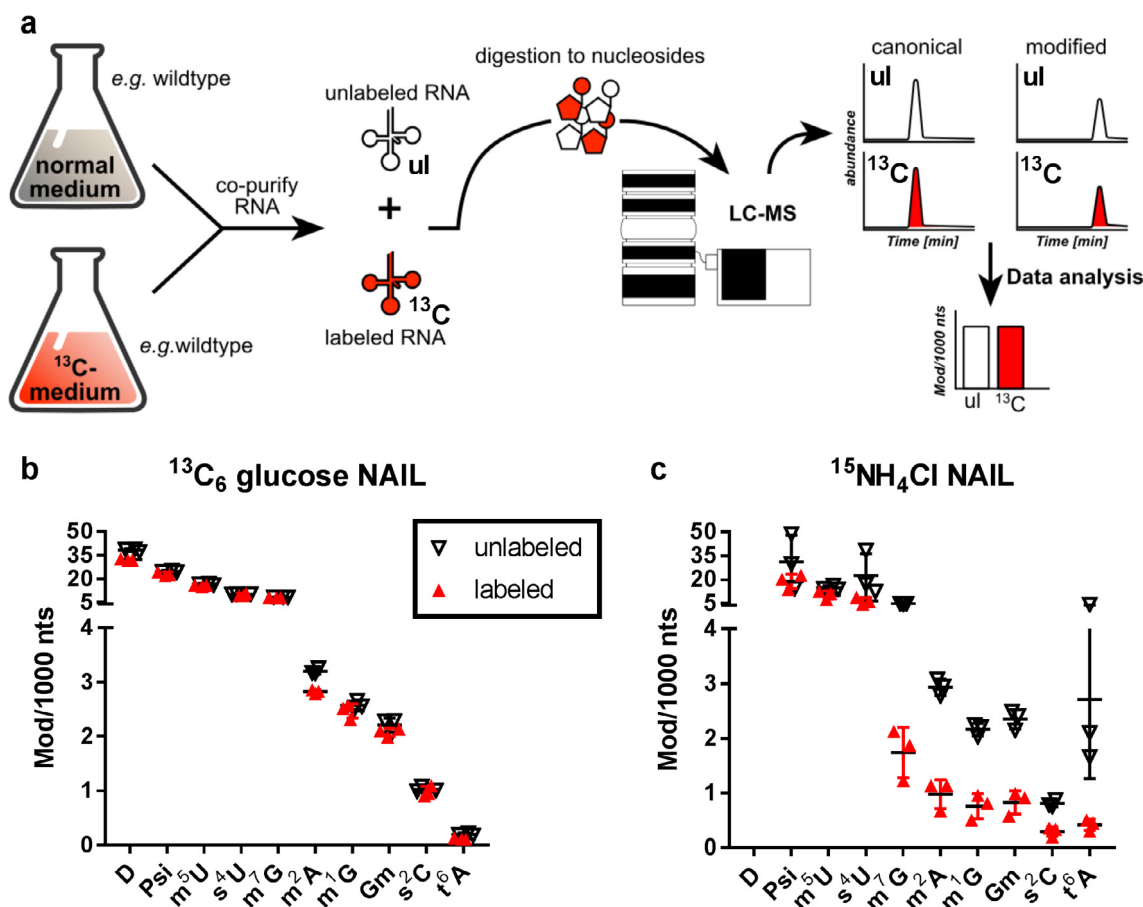
For validation of multiplexing and dynamic NAIL-MS we further recommend a control multiplexing experiment as shown in Fig. 4a. The media of choice is prepared in the unlabeled and isotopically labeled

variant.

At this step it is crucial that both media are identical except for the isotope composition. Small differences in media composition already influence the abundance of modified nucleosides and the validation result. Thus, we recommend parallel preparation of the media using labeled and unlabeled stock solutions (!).

The two media are inoculated with the same number of cells and grown in parallel under identical conditions. After the appropriate amount of time (e.g. overnight for *E. coli*, 24 h for yeast and 5 days for HEK cells), the cells are harvested in e.g. TRI<sup>®</sup> reagent and mixed in a single container. From now on all processing steps are performed in parallel to avoid purification biases. From the isolated total RNA, the RNA of interest (e.g. tRNA) is isolated and prepared for LC-MS/MS by enzymatic digestion. The sample contains labeled and unlabeled nucleosides, and the amount of each modified nucleoside can be determined, normalized and plotted. Fig. 4b shows a successful validation of an *E. coli*  $^{13}\text{C}_6$ -glucose labeling procedure. Here, the quantities of most modified nucleosides from total tRNA are identical in labeled and unlabeled media.

The abundance of D (dihydrouridine) is in general higher in the  $^{12}\text{C}$  samples compared to the  $^{13}\text{C}$  samples. This is explained by contaminating  $^{12}\text{C}$ -dihydrouridine from the used deaminase inhibitor tetrahydrouridine. Other uridine and cytidine derivatives showed a comparable modification profile in the  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  tRNA. A more than 1.1 fold difference in modification density is observed for m<sup>2</sup>A. The



**Fig. 4.** **a** The principle of comparative NAIL-MS for validation of labeling. **b** and **c** *E. coli* comparative NAIL validation from a  $^{13}\text{C}$  labeled culture mixed with an unlabeled culture (**b**) and a  $^{15}\text{N}$ -labeled culture mixed with an unlabeled culture (**c**). y-axis labeling: Mod. per 1000 nts (Modification per 1000 nucleotides). Results from labeled RNA are marked in red, from unlabeled in black. (data represents 3 biol. replicates and error bars reflect the standard deviation.) (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

observed fold difference between labeled and unlabeled tRNA is defined as the limit of precision in comparative NAIL-MS experiments and should be given in a table for any NAIL-MS study (Supplementary Table S1). The  $^{13}\text{C}_6$ -glucose labeling can be used for comparative NAIL studies of organisms with varying genetic background or under various growth conditions. It is also very useful if samples from complex purification procedures are compared as co-purification eliminates potential purification biases. It is also suitable for pulse-chase NAIL-MS studies, which focus on both the original RNA modification content and the new transcript modification content.

Fig. 4c shows the validation of a  $^{15}\text{N}$  labeling technique in *E. coli*, which is less successful. Here, we observe lower modification content in the  $^{15}\text{N}$  labeled bacterial tRNA compared to the unlabeled tRNA. The limit of precision of this validation experiment is larger as shown in Supplementary Table S1.  $^{15}\text{N}$  labeling is more error prone compared to  $^{13}\text{C}$  labeling in *E. coli* due to the media preparation. M9 media requires the preparation of a M9 salt stock, which also contains the  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  salt for  $^{15}\text{N}$  labeling. This M9 stock mix has a limited shelf life, and upon aging of the M9 stock mix the modification content in bacteria changes. Thus,  $^{15}\text{N}$  labeling can be only used for comparative NAIL when both unlabeled and labeled M9 stock mix are freshly prepared and ideally in parallel. For pulse-chase NAIL-MS  $^{15}\text{N}$  labeling is acceptable if, for example, the labeling is only used to distinguish original RNA from newly transcribed RNA. In these studies, modification profiles cannot be compared, but changes in the RNA modification profile of e.g. original RNA can be studied and effects of transcription can be excluded.

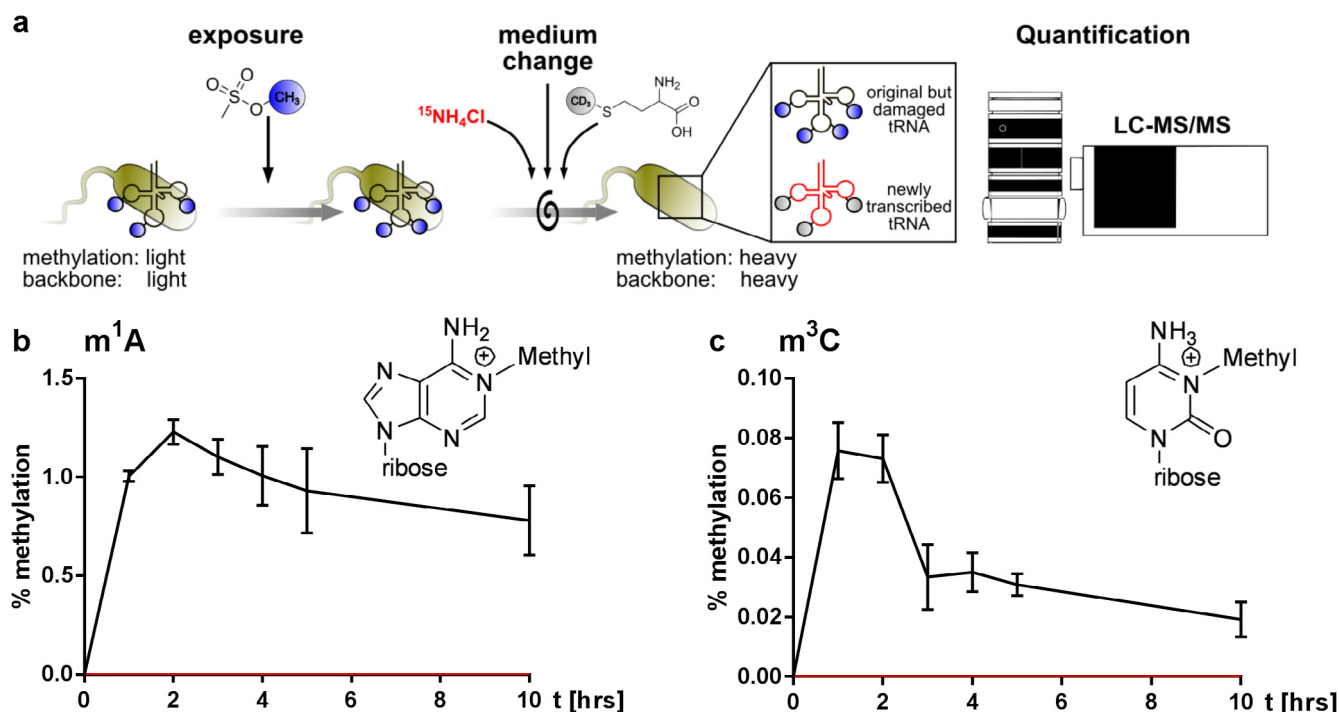
## 4. Results

### 4.1. Observing the repair of methylation damage in *E. coli* tRNA by pulse-chase NAIL-MS

We recently applied NAIL-MS to discriminate the origin of methylated RNA nucleosides in *E. coli* treated with the methylating agent MMS. We observed direct methylation of all canonical nucleosides and 7-methylguanosine, 1-methyladenosine, 6-methyladenosine, 3-methylcytidine and 3-methyluridine as the main damage products. In a dynamic NAIL-MS assay we followed the fate of these damage products and we observed demethylation of 1-methyladenosine and 3-methylcytidine after 24 h [27]. Here, we want to present the assay in more detail and we performed a NAIL-MS time-course experiment, which allows the determination of the demethylation kinetics. An assay to observe the repair of methylated RNA nucleosides is possible by NAIL-MS under the following conditions: A) A “backbone” labeling technique is needed, which allows discrimination of the damaged RNA from newly transcribed RNA. B) Availability of a labeling technique, which additionally distinguishes the damaged modification from the natural modification (here  $\text{CD}_3$ -methyl groups) [27]. C) The “damage” label and “backbone” label must be sufficiently resolvable in the mass spectrometer, i.e. if the “damage” label is +3, the “backbone label” cannot be +3 but should be ideally larger than +5. D) An internal standard must be available which is clearly distinguishable from all potential heavy isotope combinations from the biological assay.

In this study, we used 15-Nitrogen for the “backbone” labeling which results in a labeling of +5 for purines, +3 for cytidine and +2





**Fig. 5.** **a** Concept of a pulse-chase NAIL-MS assay to distinguish the modified nucleosides from damaged tRNAs and newly transcribed tRNAs. (Adapted from [27].) **b** and **c** Pulse-chase NAIL-MS assay for 1-methyladenosine (**b**,  $m^1A$ ) and 3-methylcytidine (**c**,  $m^3C$ ). Color code: Black: damaged tRNAs. Red: newly transcribed tRNAs (Error bars represent the standard error of 3 biological replicates.)

**Table 2**

Mass transitions of 1-methyladenosine isotopomers in pulse-chase NAIL-MS for RNA repair observation.

Compound Group	Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Ret Time (min)
Unlabeled (original)	A	268	136	5.7
	$m^1A$	282	150	1.7
$^{15}N$ and $^{13}C$ labeled (internal standard)	A SILIS	283	146	5.7
	$m^1A$ SILIS	298	161	1.7
$CD_3$ labeled (post-methylated)	$m^1A$ $CD_3$	285	153	1.7
$^{15}N$ labeled (new)	A $^{15}N$	273	141	5.7
$^{15}N$ and $CD_3$ labeled (new)	$m^1A$ $^{15}N$ $CD_3$	290	158	1.7

for uridine. As the “damage/methylation” label we used  $CD_3$ -methionine (+3). The assay was set up as outlined in Fig. 5a and samples were drawn every hour after removal of the MMS. The bacteria are grown in unlabeled M9 media and exposed to the  $LD_{50}$  dose of MMS (Supplementary Fig. S1). The original RNA as well as all methylated nucleosides were unlabeled ( $m/z \pm 0$ ). After 60 min, the MMS is removed by media exchange. The new media contains only  $^{15}N$  as the nitrogen source and  $CD_3$ -methionine. Newly transcribed RNA is now labeled with  $^{15}N$  ( $m/z + 5$ , +3 or +2) and methylated nucleosides have an additional +3 label ( $m/z$  is thus +8, +6 or +5). Original tRNA, which is enzymatically methylated after media exchange receives a +3 label from the  $CD_3$ -methionine ( $m/z$  is thus +3). Using mass spectrometry, the tRNA exposed to the MMS and the newly transcribed tRNA can be clearly distinguished and the abundance of modified nucleosides in the original tRNA can be quantified. An exemplary list for the mass transitions of all  $m^1A$  isotopomers is given in Table 2 and for the other nucleosides in Supplementary Table S3. Here, and in the recently published study [27], we solely focused on the fate of the damaged tRNA from unlabeled bacteria culture. In such a case, the validation of NAIL-MS can be omitted, as the modification profile of the new transcripts is not of interest.

In *E. coli*, the quantities of the usually unnatural nucleosides  $m^1A$  and  $m^3C$  peak after 2 h with around 1% damaged adenosines (Fig. 5b) and only 0.08% damaged cytidines (Fig. 5c) in tRNA. The abundance of  $m^1A$  is slowly decreasing in the damaged tRNA over the 10 h recovery period. Two potential scenarios can explain this: The first scenario is degradation of  $m^1A$ -damaged tRNAs. The sequence of each tRNA contains at least 10 adenines in *E. coli* [1]. 1% of all adenosine methylation damage thus translates to a statistical abundance of  $m^1A$  in 1 out of 10 tRNAs. Thus 10% of the total tRNA pool needs to be degraded for removal of  $m^1A$ . If  $m^1A$ -targeted tRNA degradation was the cause, a faster tRNA dilution rate in comparison to unstressed *E. coli* would be observable. However, we observe the opposite (Supplementary Fig. S2b). The original tRNA pool from MMS stressed bacteria is less quickly diluted by newly transcribed tRNA in comparison to the unstressed bacteria. Thus, we consider the scenario of  $m^1A$ -targeted tRNA degradation as unlikely.

The second scenario is the proposed repair by demethylation. We see this hypothesis as proven, since we did not observe increased degradation of the original, damaged tRNA pool. Therefore, the only cause for the decrease in  $m^1A$  abundance is active demethylation of  $m^1A$  (potentially by AlkB [28]).

With our NAIL-MS assay, we can also follow the speed of  $m^3C$  repair by demethylation *in vivo*. The repair is even quicker (Fig. 5c), which is most likely caused by the comparably low abundance of  $m^3C$  sites in the tRNAs.

## 5. Discussion and outlook

LC-MS/MS is the method of choice for quantification of modified nucleosides. However, it is currently limited and only provides data on the quantities of modified nucleosides in an RNA but not about the dynamic changes and the underlying mechanisms. These limitations can be overcome by using nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry (NAIL-MS). We present currently used approaches of isotope labeling in microorganisms such as *E. coli* and *S. cerevisiae*. Furthermore, we demonstrate the difficulties of adapting these methods

to human cell culture. In our hands, cell culture labeling by addition of  $^{13}\text{C}_6$ -glucose is not sufficient to allow successful application of comparative NAIL-MS experiments. However, for dynamic pulse-chase experiments where e.g. only the original RNA is the focus of the analysis, the labeling should allow sufficient resolution to distinguish the original RNA from new transcripts. Thus, we foresee a wide usage of cell culture labeling by addition of  $^{13}\text{C}_6$ -glucose in dynamic NAIL-MS experiments to answer current questions regarding open questions in the field such as: Is the change in the epitranscriptome due to a complete renewal of the transcriptome? Are modifications added to the existing transcriptome to confront e.g. stress? And are modifications removed actively *in vivo*? Due to the many isotopomers formed for each nucleoside and its respective modifications, we also foresee that massive validation is necessary to answer these questions by  $^{13}\text{C}_6$ -glucose in dynamic NAIL-MS. Ideally, other metabolites, e.g. precursors of nucleoside biosynthesis are found which lead to single isotopomer formation in cell culture. Thus, the usage of comparative NAIL and more elegant pulse-chase experiments would become possible in cell culture.

Regarding comparative NAIL-MS, we also foresee a unique opportunity towards determination of changes in RNA abundance as a consequence of stress or the loss of an RNA modification. Instead of quantifying the abundance of modified nucleosides, it should be possible to focus on the quantities of canonical nucleosides instead. As Fig. 6 shows, the total RNA from a comparative NAIL experiment is analyzed and the ratio of canonical nucleosides from labeled and unlabeled total RNA is determined. The ratio from the total RNA is later used for normalization and set to 100%. From the total RNA mixture, the RNA of interest, here isoacceptor tRNAs, can be purified [29]. The quantities of canonical nucleosides from an isoacceptor tRNA can be determined and subsequently the ratio of labeled and unlabeled is formed. In a control experiment, the abundance of all tRNA isoacceptors is expected to be identical in the unlabeled and labeled samples. The ratio of the pure isoacceptor tRNA can be compared to the total RNA ratio and plotted in %. Indeed, we observe in our  $^{13}\text{C}_6$ -glucose validation experiments from *E. coli* (Fig. 6) the same ratio of labeled and unlabeled canonical nucleosides for total RNA and several purified tRNA isoacceptors.

In a comparative NAIL experiment, it should be possible to detect changes in e.g. tRNA isoacceptor abundances because of stress or genetic manipulation of an RNA writer. By mixing an unlabeled control sample with a labeled, but e.g. stressed sample, the potential changes of tRNA isoacceptor abundance should be detectable. We expect that the ratio of canonical nucleosides would be different in total RNA and the purified tRNA isoacceptor and thus the impact of the stress on the relative abundance of the tRNA isoacceptor should be revealed. If our assumption is correct, we see a broad usability of comparative NAIL-MS

to determine relative abundances of RNAs.

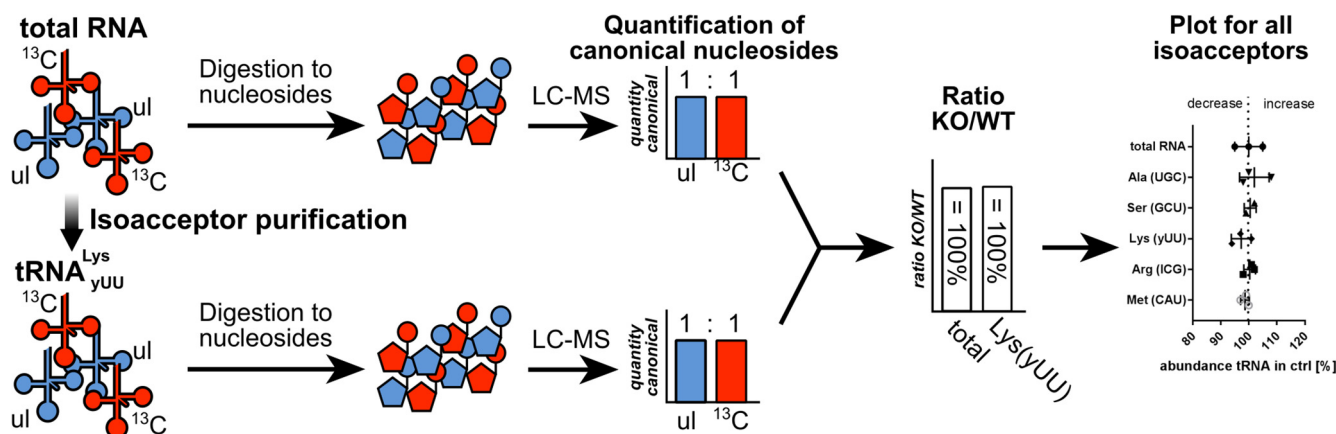
As an example, we show the repair kinetics of 1-methyladenosine ( $\text{m}^1\text{A}$ ) and 3-methylcytidine ( $\text{m}^3\text{C}$ ) in bacterial tRNA after exposure to MMS *in vivo*. We find that  $\text{m}^1\text{A}$  is slowly removed from original tRNA over the timeframe of observation. This is in accordance with previous work done with radioisotope labeling [28]. In contrast to the published work, we used *E. coli* without previous induction of AlkB which is reflected in the rather slow repair of  $\text{m}^1\text{A}$  observed in our NAIL-MS study. Similarly, we can observe the removal of  $\text{m}^3\text{C}$  from the bacterial tRNA which appears to happen a lot faster. The reason can be the relatively low abundance of  $\text{m}^3\text{C}$  damage compared to  $\text{m}^1\text{A}$  damage. It is also possible that  $\text{m}^3\text{C}$  is the better substrate for the tRNA demethylase.

In this study, we found around 1% of all adenines in tRNA are methylated by the methylating agent MMS after one hour of exposure to the  $\text{LD}_{50}$  dose. From a chemical point of view, the N1 position of adenine can be considered a good nucleophile which is easily methylated by an electrophile such as MMS. Therefore, we wonder how strongly the N1 position of adenine interacts with natural electrophiles such as S-adenosyl methionine (SAM). SAM is the natural methylating agent of the cell, and the methylation reaction of nucleic acids usually depends on an enzyme which activates the nucleoside first. However, chemically, the N1 position of adenosine is already a good nucleophile, and it should be possible, that some methylation occurs by reaction with SAM inside the cell, especially in those environments, which are rich in SAM and those RNAs that have one or more non base-paired adenines. Considering the current dispute on the distribution of  $\text{m}^1\text{A}$  in mRNA [30–32], we wonder if some of the 0.02%  $\text{m}^1\text{A}$  (per A) [33] in mRNA is due to non-enzymatic methylation by SAM. In eukaryotic mRNA, the 5' end is methylated ( $\text{m}^7\text{G}$  of the mRNA cap) and thus the 5' end and its adenines are always exposed to high amounts of SAM. Statistically, a sub-stoichiometric methylation of these adenines is possible and should be taken into account during data interpretation. Of course, the origin of the 5' UTR methylation, enzymatic or chemical, does not play a major role upon determining the function of the methylated adenosine.

With nucleic acid isotope labeling coupled mass spectrometry (NAIL-MS) we overcome current limitations and assess the dynamics of RNA modifications. We show the repair of  $\text{m}^1\text{A}$  and  $\text{m}^3\text{C}$  *in vivo* by discriminating the concurrent processes for removal of RNA methylation, namely RNA degradation, turnover and dilution. Dynamic NAIL-MS and comparative NAIL-MS are powerful tools which finally allow the observation of dynamic processes of RNA and its modifications.

## Acknowledgements

The Kellner lab thanks Thomas Carell and his group for instrument



**Fig. 6.** Concept of relative tRNA isoacceptor abundance determination by NAIL-MS. The ratio of co-purified total RNA from unlabeled (ul) and  $^{13}\text{C}$  labeled cells is 1:1 in this example. From the same RNA sample, a tRNA isoacceptor is purified by oligonucleotide hybridization. After digestion the ratio of the canonical nucleosides is determined and compared to the ratio from total RNA. The resulting data of each isoacceptor tRNA is plotted for all isoacceptors ( $n = 3$ ).

time (high-resolution mass spectrometer) and valuable discussion. The bacteria projects are funded by the Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt, Germany (FCI) and the DFG (CIPSM and SFB 1309). Yeast work was funded by the SPP 1784 of the DFG and the cell culture work by the Emmy Noether program of the DFG. VFR is funded by the FCI.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.10.025>.

## References

- [1] P. Boccaletto, et al., MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update, *Nucleic Acids Res.* 46 (D1) (2018) D303–D307.
- [2] W.M. Cai, et al., A platform for discovery and quantification of modified ribonucleosides in RNA: application to stress-induced reprogramming of tRNA modifications, *Methods Enzymol.* 560 (2015) 29–71.
- [3] K. Thuring, et al., Analysis of RNA modifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Methods* 107 (2016) 48–56.
- [4] C. Wetzel, P.A. Limbach, Mass spectrometry of modified RNAs: recent developments, *Analyst* 141 (1) (2016) 16–23.
- [5] C. Brandmayr, et al., Isotope-based analysis of modified tRNA nucleosides correlates modification density with translational efficiency, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (44) (2012) 11162–11165.
- [6] T. Bruckl, et al., Parallel isotope-based quantification of modified tRNA nucleosides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (42) (2009) 7932–7934.
- [7] D. Pearson, et al., LC-MS based quantification of 2'-ribosylated nucleosides Ar(p) and Gr(p) in tRNA, *Chem. Commun. (Camb.)* 47 (18) (2011) 5196–5198.
- [8] S. Kellner, et al., Absolute and relative quantification of RNA modifications via biosynthetic isotopomers, *Nucleic Acids Res.* 42 (18) (2014) e142.
- [9] M. Heiss, V.F. Reichle, S. Kellner, Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS, *RNA Biol.* 14 (9) (2017) 1260–1268.
- [10] L.P. Sarin, et al., Nano LC-MS using capillary columns enables accurate quantification of modified ribonucleosides at low femtomol levels, *RNA* 24 (10) (2018) 1403–1417.
- [11] C. Dal Magro, et al., A vastly increased chemical variety of RNA modifications containing a thioacetal structure, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57 (26) (2018) 7893–7897.
- [12] J.J. Thiaville, et al., Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (11) (2016) E1452–E1459.
- [13] C.E. Dumelin, et al., Discovery and biological characterization of geranylated RNA in bacteria, *Nat. Chem. Biol.* 8 (11) (2012) 913–919.
- [14] S. Kellner, et al., Profiling of RNA modifications by multiplexed stable isotope labelling, *Chem. Commun. (Camb.)* 50 (26) (2014) 3516–3518.
- [15] N.L. Anderson, N.G. Anderson, Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words, *Electrophoresis* 19 (11) (1998) 1853–1861.
- [16] R. Apweiler, et al., Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics, *Cytometry A* 75 (10) (2009) 816–832.
- [17] S.E. Ong, et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Mol. Cell. Proteomics* 1 (5) (2002) 376–386.
- [18] N.A. Rosa-Mercado, J.B. Withers, J.A. Steitz, Settling the m(6)A debate: methylation of mature mRNA is not dynamic but accelerates turnover, *Genes Dev.* 31 (10) (2017) 957–958.
- [19] K.D. Meyer, S.R. Jaffrey, The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (5) (2014) 313–326.
- [20] C.T. Chan, et al., A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress, *PLoS Genet.* 6 (12) (2010) e1001247.
- [21] P.A. Aas, et al., Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA, *Nature* 421 (6925) (2003) 859–863.
- [22] S. Kellner, et al., Oxidation of phosphorothioate DNA modifications leads to lethal genomic instability, *Nat. Chem. Biol.* 13 (8) (2017) 888–894.
- [23] Y.H. Chionh, et al., A multidimensional platform for the purification of non-coding RNA species, *Nucleic Acids Res.* 41 (17) (2013) e168.
- [24] P. van Delft, et al., The profile and dynamics of RNA modifications in animals, *ChemBioChem* 18 (11) (2017) 979–984.
- [25] T. Pfaffeneder, et al., Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA, *Nat. Chem. Biol.* 10 (7) (2014) 574–581.
- [26] M. Bachman, et al., 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification, *Nat. Chem.* 6 (12) (2014) 1049–1055.
- [27] V.F. Reichle, V. Weber, S. Kellner, NAIL-MS in *E. coli* determines the source and fate of methylation in tRNA, *ChemBioChem* (2018).
- [28] R. Ougland, et al., AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation, *Mol. Cell* 16 (1) (2004) 107–116.
- [29] R. Hauenschild, et al., The reverse transcription signature of N1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent, *Nucleic Acids Res.* 43 (20) (2015) 9950–9964.
- [30] S. Schwartz, m(1)A within cytoplasmic mRNAs at single nucleotide resolution: a reconciled transcriptome-wide map, *RNA* 24 (11) (2018) 1427–1436.
- [31] X. Xiong, X. Li, C. Yi, N(1)-methyladenosine methylome in messenger RNA and non-coding RNA, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 45 (2018) 179–186.
- [32] X. Li, et al., Base-resolution mapping reveals distinct m(1)A methylome in nuclear- and mitochondrial-encoded transcripts, *Mol. Cell* 68 (5) (2017) 993–1005.e9.
- [33] X. Li, et al., Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N(1)-methyladenosine methylome, *Nat. Chem. Biol.* 12 (5) (2016) 311–316.



## Quantification of Modified Nucleosides in the Context of NAIL-MS

Matthias Heiss, Kayla Borland, Yasemin Yoluç, and Stefanie Kellner

### Abstract

Recent progress in epitranscriptome research shows an interplay of enzymes modifying RNAs and enzymes dedicated for RNA modification removal. One of the main techniques to study RNA modifications is liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as it allows sensitive detection of modified nucleosides. Although RNA modifications have been found to be highly dynamic, state-of-the-art LC-MS/MS analysis only gives a static view on modifications and does not allow the investigation of temporal modification placement. Here, we present the principles of nucleic acid isotope labeling coupled with mass spectrometry, termed NAIL-MS, which overcomes these limitations by stable isotope labeling in human cell culture and gives detailed instructions on how to label cells and process samples in order to get reliable results. For absolute quantification in the context of NAIL-MS, we explain the production of internal standards in detail. Furthermore, we outline the requirements for stable isotope labeling in cell culture and all subsequent steps to receive nucleoside mixtures of native RNA for NAIL-MS analysis. In the final section of this chapter, we describe the distinctive features of NAIL-MS data analysis with a special focus toward absolute quantification of modified nucleosides.

**Key words** Epitranscriptome, RNA modification, Stable isotope labeling, Mass spectrometry, tRNA, LC-MS/MS

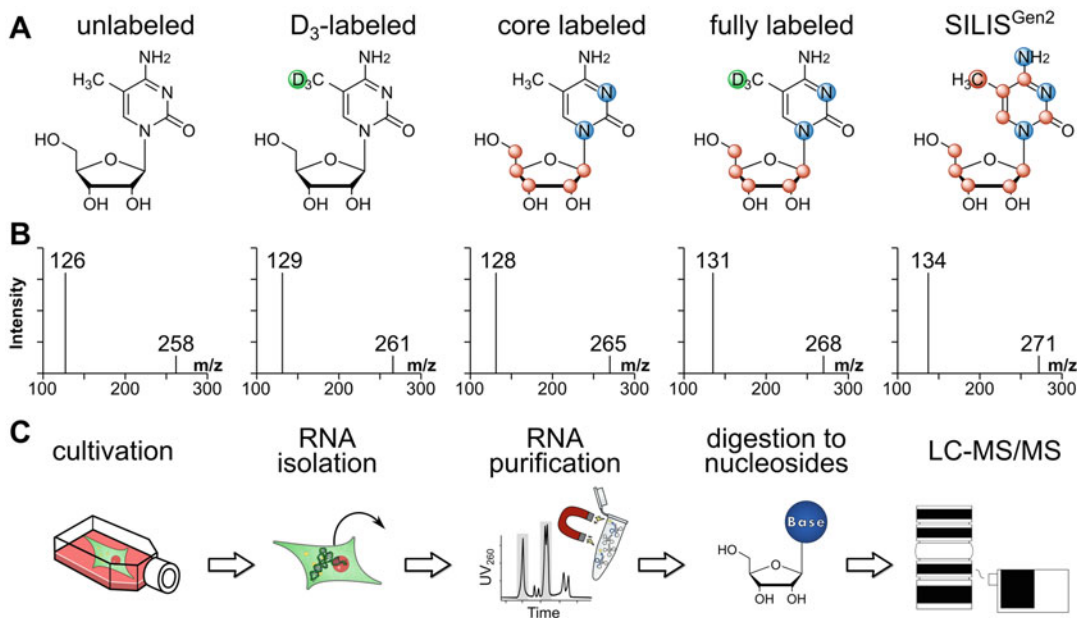
## 1 Introduction

RNA fulfills major functions for example in translation or gene regulation and requires an extended set of building blocks to allow this functionality. For this purpose, RNA is chemically modified by dedicated enzymes at predefined positions. To study the impact and function of RNA modifications two techniques are primarily used. The first one is sequencing that often exploits the chemical reactivity of modified nucleosides [1, 2] or requires antibodies specific to a modification of interest [3]. The second technique is mass spectrometry coupled for example with complete enzymatic digestion of RNA to the nucleoside level. The resulting nucleoside mixture is analyzed by liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Firstly, the nucleosides

are separated on the HPLC by their physicochemical attributes and then analyzed in the mass spectrometer. To allow absolute quantification of modified nucleosides, stable isotope-labeled internal standards (SILIS) are used. These can be produced synthetically [4] or biosynthetically. The SILIS is added to the calibration solutions and samples in defined amounts [5–7].

Sequencing and mass spectrometry are often used as orthogonal techniques to clearly define the modification status of RNA at a given time point. Both techniques do not allow the tracing of modified nucleosides over time and the mechanisms of their placement, their dynamics, and potential removal often remain elusive. This problem can be overcome by metabolic labeling of the RNA in a pulse-chase setup. This technique, termed nucleic acid isotope labeling-coupled mass spectrometry (NAIL-MS), relies on stable isotope-labeled nutrients (e.g., *E. coli* [8], yeast [9], human cells [10]) which results in the formation of nucleosides with a defined number of stable isotopes (isotopologue). An example of isotopologues resulting from NAIL-MS experiments is given in Fig. 1a. Isotopologues possess the same physicochemical attributes and consequently co-elute. Even though isotopologues are not separated on the HPLC, these nucleosides can be differentiated due to their different masses, and thus a signal can be assigned to the pulse or chase phase of the experiment. By the additional introduction of a labeled methyl group, the origin and fate of methylation marks, the most prominent type of RNA modifications, can be studied in a time-resolved fashion. To allow absolute quantification in the context of NAIL-MS a suitable SILIS is needed, which does not interfere with the signals from all emerging isotopologues of a nucleoside resulting from a NAIL-MS experiment. In a sophisticated setup, such as our recently reported study in human cell lines [10], more than five different isotopologues of the modified nucleosides can be reliably differentiated by mass spectrometry. Sensitive quantification is commonly achieved by tandem mass spectrometry (MS/MS). Here, the first mass analyzer selects the ionized nucleoside as the precursor ion and passes it on to the fragmentation chamber. The common fragmentation pattern of modified nucleosides is the cleavage of the glycosidic bond, which results in the formation of a neutral ribose moiety while the charge remains on the nucleobase (Fig. 1b). The charged nucleobase (product ion) is then selected in the second mass analyzer and enters the detector. A key problem of many mass spectrometers is the slow transition of the product ion into the second MS which might result in false signals if the product ion  $m/z$  of two isotopologues are identical. Thus, we recommend a labeling scheme which leads to nucleobase isotopologues. In this work, we give a complete workflow on human cell culture NAIL-MS (Fig. 1c) and an overview of modified nucleosides available for NAIL-MS analysis





**Fig. 1** Principles of NAIL-MS in cell culture. **(a)** Structure of 5-methylcytidine ( $m^5C$ ) and various isotopologues which emerge in a human cell culture NAIL-MS experiment. **(b)** MS/MS spectra of the various  $m^5C$  isotopologues shown in A. **(c)** General workflow of a NAIL-MS experiment. First cells are cultured in stable isotope-labeled media. RNA is isolated and purified. After digestion to nucleosides, LC-MS/MS is performed

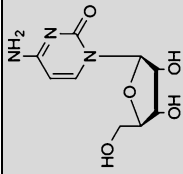
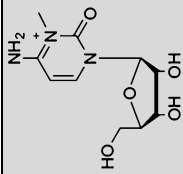
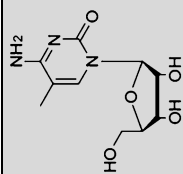
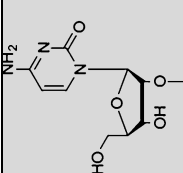
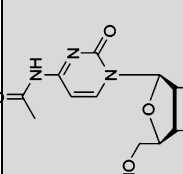
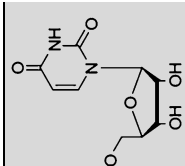
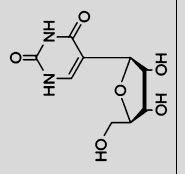
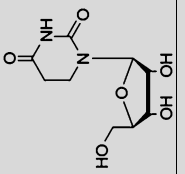
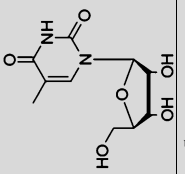
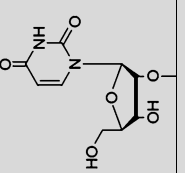
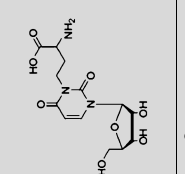
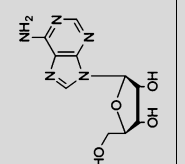
(Table 1) and point out the important steps for successful application of NAIL-MS experiments.

2 Materials

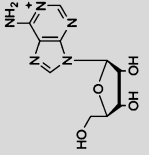
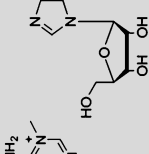
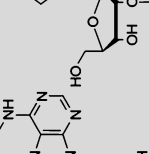
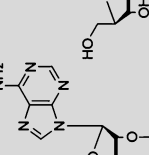
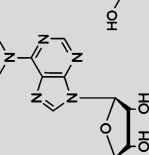
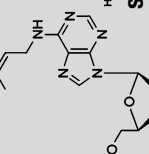
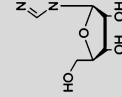
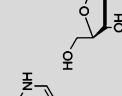
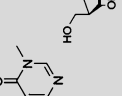
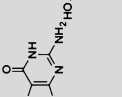
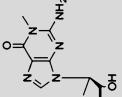
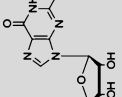
2.1 Stable Isotope Labeling in Cell Culture

- Prepare all solutions and buffers in ultrapure type I water. All steps starting from RNA isolation should be performed with RNase-free equipment and reagents. For LC-MS/MS analysis only use salts and reagents of LC-MS grade.
1. Cell line of interest (here HEK293 cells are used).
  2. L-Methionine-methyl-D<sub>3</sub> (98% atom, Sigma-Aldrich).
  3. <sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uridine (ribose-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, 98% atom; <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, 96–98% atom, Cambridge Isotope Laboratories).
  4. <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-adenine (<sup>15</sup>N<sub>5</sub>, 98% atom, Cambridge Isotope Laboratories).
  5. Growth medium: Dulbecco's modified Eagle media (DMEM) D0422, 10% dialyzed FBS, 0.584 g/L L-glutamine, 0.063 g/L cystine, 0.03 g/L methionine, 0.05 g/L uridine, and 0.014 g/L adenine.
  6. Quenching medium: DMEM D0422, 10% dialyzed FBS.

**Table 1**  
**Summary of nucleosides that can be quantified in cellular RNAs**

						
A	C (1)	m <sup>3</sup> C (2)	m <sup>5</sup> C (2)	Cm (2)	ac <sup>4</sup> C (2)	U (1)
B	244 → 112	258 → 126	258 → 126	258 → 112	286 → 154	245 → 113
C	<i>n.a.</i>	261 → 129	261 → 129	261 → 112	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
D	<i>n.a.</i>	265 → 128	265 → 128	265 → 114	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
E	251 → 114	268 → 131	268 → 131	268 → 114	293 → 156	252 → 115
F	253 → 116	270 → 133	270 → 133	270 → 116	297 → 160	254 → 117
G	256 → 119	271 → 134	271 → 134	271 → 119	300 → 163	256 → 119
						
A	Ψ (2)	D (3)	m <sup>5</sup> U (2)	Um (2)	ap <sup>3</sup> U (6)	A (1)
B	245 → 209	247 → 115	259 → 127	259 → 113	346 → 214	268 → 136
C	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	262 → 130	262 → 113	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
D	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	266 → 129	266 → 115	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
E	252 → 216	254 → 117	269 → 132	269 → 115	353 → 216	273 → 141
F	254 → 218	256 → 119	271 → 134	271 → 117	359 → 222	278 → 141
G	256 → 220	258 → 121	271 → 134	271 → 119	362 → 225	283 → 146

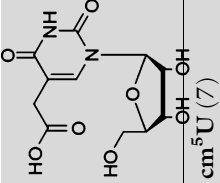
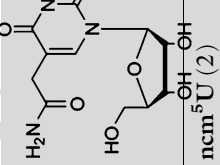
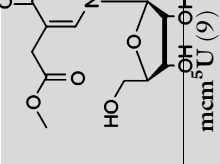
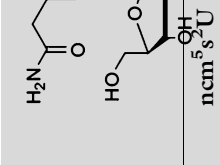
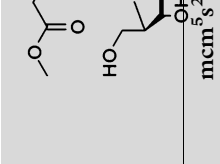


t.18						
t.19	Am <sup>1</sup> A (2)	m <sup>6</sup> A (2)	Am (2)	m <sup>6</sup> A (4)	i <sup>6</sup> A (7)	t <sup>6</sup> A (5)
t.20	B 282 → 150	282 → 150	282 → 136	296 → 164	336 → 204	413 → 281
t.21	C 285 → 153	285 → 153	285 → 136	302 → 156	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
t.22	D 287 → 155	287 → 155	287 → 141	301 → 155	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
t.23	E 290 → 158	290 → 158	290 → 141	307 → 161	341 → 209	418 → 286
t.24	F 295 → 158	295 → 158	295 → 141	312 → 175	351 → 214	428 → 291
t.25	G 298 → 161	298 → 161	298 → 146	313 → 176	356 → 219	434 → 297
t.26						
t.27	AI (2)	m <sup>1</sup> I (5)	G (1)	m <sup>1</sup> G (2)	m <sup>2</sup> G (1)	m <sup>7</sup> G (2)
t.28	B 269 → 137	283 → 137	284 → 152	298 → 166	298 → 166	298 → 166
t.29	<i>C n.a.</i>	286 → 154	<i>n.a.</i>	301 → 169	301 → 169	301 → 169
t.30	<i>D n.a.</i>	287 → 155	<i>n.a.</i>	302 → 170	302 → 170	302 → 170
t.31	E 273 → 141	290 → 158	294 → 157	305 → 173	305 → 173	305 → 173
t.32	F 279 → 142	296 → 145	294 → 157	311 → 174	311 → 174	311 → 174
t.33	G 283 → 146	298 → 161	299 → 162	314 → 177	314 → 177	314 → 177

(continued)

t.51  
t.52  
t.34  
t.35  
t.36  
t.37  
t.38  
t.39  
t.40  
t.41

**Table 1**  
(continued)


				
A	cm <sup>5</sup> U (7)	ncm <sup>5</sup> U (2)	mcm <sup>5</sup> U (9)	mcm <sup>5</sup> U (2)
B	303 → 171	302 → 170	317 → 185	333 → 201
C	n.a.	n.a.	320 → 188	336 → 204
D	n.a.	n.a.	324 → 187	340 → 203
E	310 → 173	309 → 172	327 → 190	343 → 206
F	314 → 177	303 → 176	331 → 194	347 → 210
G	316 → 179	316 → 179	331 → 194	347 → 210

Abbreviation of modified nucleoside (A), mass transitions for unlabeled (B), D<sub>3</sub>-label (C), core label (D), full label (E), SILIS<sup>Gm1</sup> (F), and SILIS<sup>Gm2</sup> (G). n.a. = not applicable. Vendors: Sigma-Aldrich (1); Carbosynth, Newbury, UK (2); Apollo Scientific, Stockport, UK (3); Alfa Chemistry, Ronkonkoma, USA (4); Toronto Research Chemicals, Toronto, CA (5). Synthesis: Kellner lab (6), Dedon lab (7), Carell lab (8) [11], Helm lab (9)

<b>2.2 SILIS Preparation</b>	1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain BY4741 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0).	100
		101
	2. <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -glucose (≥99% atom, Eurisotop, Saarbruecken, Germany).	102
		103
	3. <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N-rich growth medium for yeast (Silantes, Munich, Germany).	104
		105
	4. TES buffer: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS.	106
		107
	5. Acidic phenol: 25 g Phenol, 10 mL ultrapure water, pH 5. Store at -20 °C.	108
		109
	6. Theophylline.	110
	7. Ultrapure water.	111
	8. 5 M NH <sub>4</sub> OAc.	112
	9. Ethanol.	113
		114
<b>2.3 RNA Isolation and Purification</b>	1. PBS.	115
	2. TRI Reagent.	116
	3. Chloroform.	117
	4. Isopropanol and 70% ethanol.	118
	5. Ultrapure water.	119
	6. HPLC system for SEC: Any isocratic system with UV detection, e.g., Agilent 1100.	120
		121
	7. SEC columns: for tRNA; AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μm, 7.8 × 300 mm and for rRNA; AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7 μm, 7.8 × 300 mm (Agilent).	122
		123
		124
	8. SEC buffer: 0.1 M NH <sub>4</sub> OAc.	125
	9. 100 μM Biotinylated DNA oligonucleotide (ON). Below is an example of a biotinylated ON used to purify tRNA <sub>Phc</sub> : [Btn] AAATGGTGCCGAAACCCGGGATCGAACCAGGGT.	126
		127
		128
	10. B&W buffer: 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl.	129
		130
	11. SSC buffer (20×): 3 M NaCl, 300 mM trisodium citrate, pH 7.0.	131
		132
	12. SSC buffer (5×, 1×, 0.1×): Dilute SSC buffer (20×) in water accordingly.	133
		134
	13. Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1.	135
		136
<b>2.4 Digestion (See Table 2)</b>	1. Alkaline phosphatase.	137
	2. Phosphodiesterase I.	138
	3. Benzonase.	139
	4. Tetrahydrouridine.	140

5. Butylated hydroxytoluene.	141
6. Pentostatin.	142
7. 20 mM MgCl <sub>2</sub> .	143
8. 100 mM Tris, pH 8.	144
9. 96-Well filter plate (10 kDa MWCO).	145
<b>2.5 LC-MS</b>	146
1. High-resolution LC-MS: For example Dionex Ultimate 3000 HPLC system coupled with LTQ Orbitrap XL.	147
2. High-sensitivity LC-MS/MS: For example Agilent 1290 Infinity II with diode array detector (DAD) and G6470A triple-quadrupole, electrospray ionization (ESI-MS) (Agilent).	149
3. Chromatography: Phenomenex <sup>®</sup> , Synergi Fusion-RP 100 Å, 2.5 µm, 150 × 2.0 mm column (Phenomenex).	150
4. LC-MS buffer/aqueous solvent (A): 5 mM NH <sub>4</sub> OAc, pH 5.3. Dissolve 0.3854 g NH <sub>4</sub> OAc in ultrapure water, add 65 µL glacial acetic acid, and bring to a final volume of 1 L in ultrapure water.	151
5. Organic solvent (B): Acetonitrile.	152
6. LC-MS vials: With 200 µL insert.	153
7. Unlabeled synthetic nucleosides for calibration (Table 1).	154
	155
	156
	157
	158
	159
	160
	161

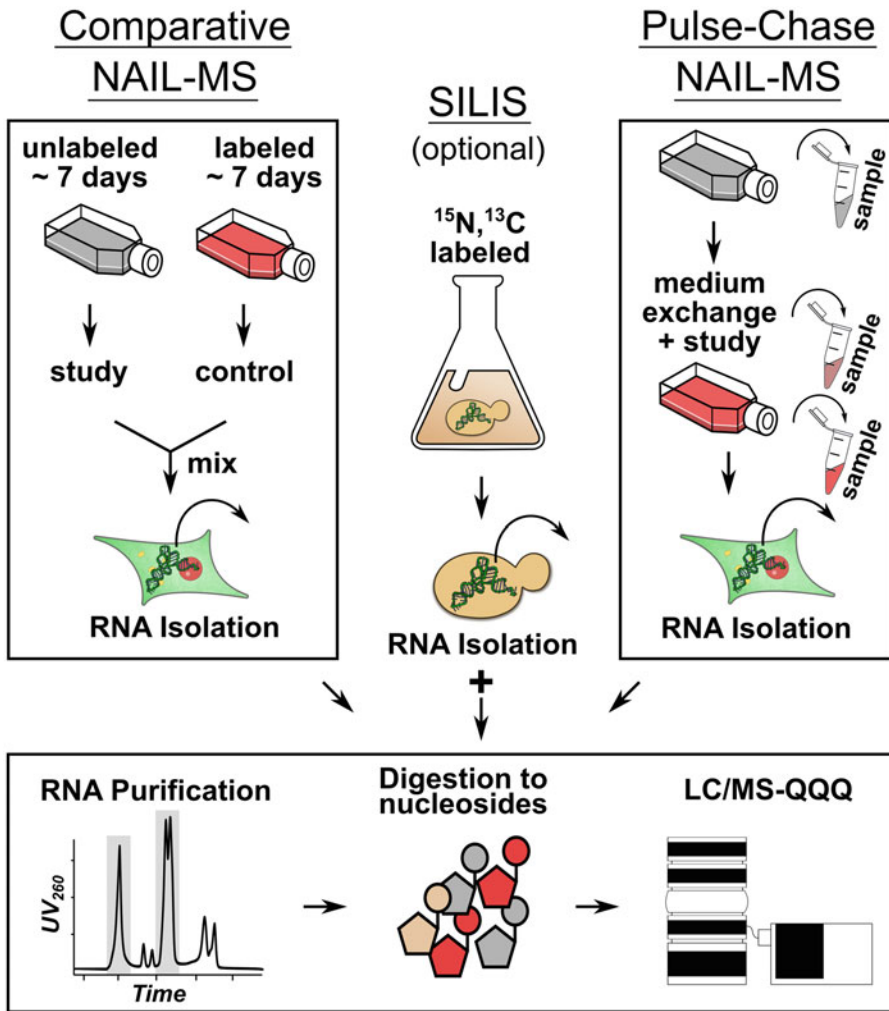
### 3 Methods

#### 3.1 General Design of NAIL-MS Experiments

NAIL-MS experiments can be subdivided into several categories depending on the purpose of the experiment. The two major categories are comparative and pulse-chase NAIL-MS. Comparative NAIL-MS experiments are comparable to SILAC proteomics experiments and are highly useful for method validation. Through pulse-chase NAIL-MS experiments, the dynamics of the epitran-scriptome are investigated (Fig. 2). It is possible to use these NAIL-MS experiments without the addition of a SILIS and determine the relative changes of RNA modifications. However, we recommend the production and addition of a SILIS in order to receive absolute values for modified nucleosides in NAIL-MS experiments.

##### 3.1.1 Considerations for SILIS Production

If a biosynthetic SILIS is used as an internal standard (ISTD), for many modifications complete labeling of all nucleosides is crucial. To circumvent an overlap with isotopologues of the NAIL-MS samples the mass increase should be as high as possible. We recommend *S. cerevisiae* for the production of a eukaryotic SILIS. Cultivation in <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-labeled Silantes complete growth medium leads to the m/z values shown in Table 1. This SILIS<sup>Gen2</sup> labeling ensures a mass difference of at least 2 Dalton (Da) to any NAIL-derived nucleosides, which is important for reliable differentiation



**Fig. 2** Experimental procedure of comparative NAIL-MS (left) and pulse-chase NAIL-MS experiments (right). Although they differ in cell handling, the downstream processing is comparable. Gray and red represent media with different stable isotope labeling. The production of SILIS is shown in the middle and its addition is recommended for absolute quantification of NAIL-MS experiments

3.1.2 Considerations for Comparative NAIL-MS

by the mass spectrometer. Our previously reported SILIS<sup>Gen1</sup> [7] is less suitable for NAIL-MS experiments as it contains some residual nucleosides with incompatible labeling (see Note 1).

Choosing the correct labeling strategy is crucial for comparative NAIL-MS experiments. The chosen medium must lead to distinct mass differences for nucleosides emerging from each culture (see Note 2). The goal is to enable mixing of the culture of interest (e.g., knockout (KO) strain, chemical treatment) and the control culture at the stage of cell lysis, followed by co-processing to reduce purification bias.

184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194

**Table 2**  
**Master mix for RNA digestion to nucleoside level**

Compound	Stock		Goal	Volume
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	→	1 mM	1.75 µl
Tris, pH = 8	100 mM	→	5 mM	1.75 µl
Benzonase	1 U/µL	→	2 U	2 µl
CIP (Alk. Phos.)	1 U/µL	→	2 U	2 µl
SPD (PDE1)	0.1 U/µL	→	0.2 U	2 µl
Pentostatin	1 mg/mL	→	1 µg	1 µl
THU	5 mg/mL	→	5 µg	1 µl
BHT	10 mM	→	10 nmol	1 µl
H <sub>2</sub> O			ad	2.5 µl

Multiply volume by sample number to prepare the proper amount of master mix. Pentostatin, THU, and BHT are added to avoid deamination and oxidation of nucleosides

**3.1.3 Considerations for Pulse-Chase NAIL-MS**

For pulse-chase experiments the same principles as described for comparative NAIL-MS apply. It is important that the exchange of medium A by medium B results in isotopologues that differ by at least 2 Da. Only then it is possible to reliably distinguish between RNA molecules already existent before the experiment's initiation and RNA molecules transcribed after the experiment's initiation (*see Note 3*). This allows the detailed study of modification dynamics in vivo.

**3.2 Preparation of SILIS (10×) in *S. cerevisiae***

1. For preparation of SILIS<sup>Gen2</sup> in *S. cerevisiae*, prepare 5 mL of <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N Silantes-rich growth medium supplemented with 1% (w/w) <sup>13</sup>C-glucose. (here: 250 µL sterile <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose stock solution (200 g/L) to 4.75 mL <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N Silantes-rich growth medium), inoculate with a single-cell colony, and cultivate yeast overnight (30 °C, 250 rpm) in a shaking incubator.
2. Dilute the culture to OD 0.1 with fresh <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N medium supplemented with <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose. We recommend a final culture volume of 100 mL. Continue cultivation for 2 days.
3. Split the culture into 50 mL aliquots and harvest the cells by centrifugation (3000 × g, 5 min, 4 °C). After discarding the supernatant, wash the pellet with 5 mL ultrapure water, transfer the suspension to clean tubes, and centrifuge again (3000 × g, 5 min, 4 °C).
4. After discarding the supernatant, resuspend each pellet in 4 mL TES buffer and add 4 mL acidic phenol to the suspension (*see Note 4*).

AU1

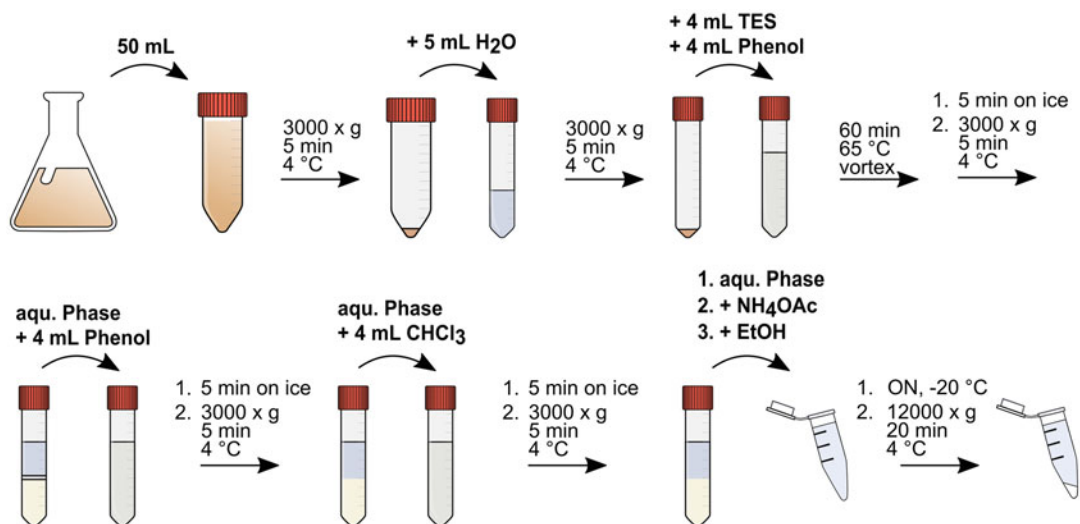
5. Incubate the sample at 65 °C for 1 h and vigorously vortex the mixture every 15 min. 222  
223
6. After 1 h of incubation, place the sample on ice for 5 min, and then centrifuge the sample ( $3000 \times g$ , 5 min, 4 °C) to induce phase separation. 224  
225  
226
7. Transfer the upper aqueous phase into a clean centrifugation tube and add 4 mL acidic phenol. Vortex this mixture vigorously for 20 s and place on ice for 5 min. Centrifuge the sample at  $3000 \times g$  for 5 min at 4 °C. 227  
228  
229  
230
8. Again, transfer the upper aqueous phase into a clean centrifugation tube and add 4 mL chloroform. Vortex this mixture vigorously and keep it on ice for 5 min. Subsequently, centrifuge the sample ( $3000 \times g$ , 5 min, 4 °C). 231  
232  
233  
234
9. Aliquot 1 mL of the resulting upper aqueous phase into 5 mL reaction tubes. Perform an ethanol precipitation with  $\text{NH}_4\text{OAc}$  followed by an ethanol wash. 235  
236  
237
10. Dissolve the resulting RNA in 250  $\mu\text{L}$  ultrapure water. The RNA isolation procedure for yeast is summarized in Fig. 3. 238  
239
11. The total RNA SILIS can be purified to tRNA and rRNA SILIS by SEC as will be described in Subheading 3.5. 240  
241
12. After purification and precipitation of tRNA or rRNA, digest 3  $\mu\text{g}$  of the RNA to nucleosides as will be described in Subheading 3.7. 242  
243  
244
13. The SILIS ( $10\times$ ) should contain 10 mM theophylline as an external standard (*see* Note 5). Therefore, prepare a 100 mM theophylline stock in water and add 15  $\mu\text{L}$  of it to 35  $\mu\text{L}$  of RNA digest and add 100  $\mu\text{L}$  of LC-MS buffer, resulting in 150  $\mu\text{L}$  of SILIS ( $10\times$ ). 245  
246  
247  
248  
249  
250

### 3.3 Stable Isotope Labeling of RNA in Cell Culture

For stable isotope labeling of HEK293 cells we chose DMEM D0422, which lacks methionine (and cysteine) and thus allows complete labeling of methyl groups [10]. Cells grown in DMEM should be kept at 5–10%  $\text{CO}_2$  for proper pH adjustment. Labeling of other cell lines and use of alternative media are also possible (*see* Note 6).

1. Prepare stock solutions of 29.2 g/L glutamine ( $50\times$ ) and 5.0 g/L uridine ( $100\times$ ) in water and freeze in aliquots. Prepare stock solutions of 15.0 g/L methionine ( $500\times$ ) and 0.7 g/L adenine ( $50\times$ ) in water and 78.8 g/L cystine in 1 M HCl and store at 4 °C. 257  
258  
259  
260  
261
2. Prepare the growth medium using DMEM D0422, dialyzed FBS, and stock solutions of glutamine ( $50\times$ ), methionine ( $500\times$ ), cystine ( $1250\times$ ), uridine ( $100\times$ ), and adenine ( $50\times$ ). For example for the preparation of 50 mL of fully labeled media mix 42.4 mL DMEM D0422 with 5 mL 262  
263  
264  
265  
266





**Fig. 3** Yeast RNA isolation procedure used for the preparation of SILIS. Yeast cells are harvested by centrifugation. The RNA is isolated by hot phenol/chloroform extraction, followed by ethanol precipitation with each step outlined

dialyzed FBS, 1 mL glutamine, 100  $\mu$ L CD<sub>3</sub>-labeled methio- 267  
nine, 40  $\mu$ L cystine, 500  $\mu$ L <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-labeled uridine, and 268  
1 mL <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-labeled adenine (Fig. 4). Otherwise, uridine, ade- 269  
nine, and methionine are either added as unlabeled or labeled 270  
compounds depending on the desired labeling (*see Note 7*). 271

3. To prevent incomplete labeling, quenching medium should be 272  
used for trypsin deactivation during splitting procedures. It 273  
consists of DMEM D0422 and dialyzed FBS only and thereby 274  
prevents the carryover of (un)labeled compounds into the new 275  
cell culture flask (*see Note 8*). 276
4. For complete labeling of HEK293 cultures, cells should be 277  
cultivated in the growth medium for at least 7 days (including 278  
at least two splitting steps with fresh medium). LC-MS/MS 279  
signals of stable isotope-labeled nucleosides are already detect- 280  
able after 1 h of labeling. 50% labeling is achieved after ~2 days 281  
of labeling. 282

### 3.4 RNA Isolation from Human Cells

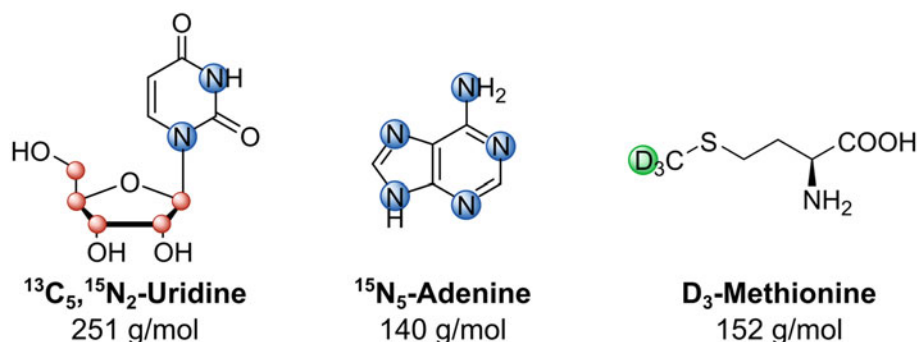
All steps starting from RNA isolation should be performed with 284  
RNase-free reagents and equipment. 285

1. After aspiration of the medium, wash cells carefully with PBS 286  
(*see Note 9*). 287
2. After aspirating PBS, cells are directly harvested and lysed in 288  
culture flasks using TRI Reagent. We suggest using 1 mL per 289  
8  $\times$  10<sup>6</sup> cells ( $\triangleq$  confluent T25 flask of HEK293). Thoroughly 290  
pipette up and down and transfer the cell suspension into a 291  
1.5 mL tube. 292

3. Vortex for 20 s and then incubate for 5 min at room temperature (*see* **Notes 10** and **11**). 293  
294
4. Add  $\frac{1}{5}$  of the volume of TRI Reagent used for cell lysis of 295  
chloroform (e.g., 200  $\mu$ L chloroform to 1 mL cell suspension 296  
in TRI Reagent) and mix thoroughly until the whole suspen- 297  
sion becomes uniformly opaque. 298
5. Leave the mixture at room temperature for 5 min and centri- 299  
fuge for 10 min at  $10,000 \times g$  at 4 °C. 300
6. Transfer the aqueous phase (upper, clear) into a new 1.5 mL 301  
tube and add an equal volume of isopropanol (e.g., ~500  $\mu$ L 302  
isopropanol per 1 mL TRI Reagent). 303
7. Mix thoroughly and precipitate RNA overnight at -20 °C (*see* 304  
**Note 12**). 305
8. Centrifuge RNA at 4 °C at  $12,000 \times g$  for 60 min. Implement a 306  
wash step with 70% ethanol. 307
9. Resuspend pellet in 30–100  $\mu$ L ultrapure water. Resuspended 308  
RNA can be stored at -20 °C for several years (*see* **Note 13**). 309  
310

### 3.5 RNA Purification by Size-Exclusion Chromatography (SEC)

1. For purification of tRNA and bulk rRNA, size-exclusion chro- 311  
matography (SEC) on an HPLC system is employed using SEC 312  
buffer as the mobile phase [12]. An AdvanceBio SEC 300 Å, 313  
2.7  $\mu$ m,  $7.8 \times 300$  mm column allows fast separation of tRNA 314  
from rRNAs using an isocratic elution at 1 mL/min with a 315  
column temperature of 40 °C [13]. After equilibration of the 316  
column for at least 30 min, up to 100  $\mu$ g of total RNA can be 317  
injected. The large rRNA subunits co-elute from 3.5 to 4.8 min 318  
and the pure tRNA elutes from 6.9 to 7.9 min (*see* **Note 14**). 319
2. For purification of 18S rRNA and 28S rRNA an AdvanceBio 320  
SEC 1000 Å, 2.7  $\mu$ m,  $7.8 \times 300$  mm column is used. Para- 321  
meters are the same as for the 300 Å column. 28S rRNA elutes 322  
from 5.0 to 7.2 min and 18S rRNA from 7.5 to 8.5 min (*see* 323  
**Note 15**). 324
3. If parallel purification of 28S rRNA, 18S rRNA, and tRNA is 325  
desired, the two columns can be installed in tandem. The 326  
1000 Å column can be directly connected behind the 300 Å 327  
column using a short piece of 0.15 mm inner diameter capil- 328  
lary. One run takes 30 min with all other chromatographic 329  
parameters remaining identical to single column use. 28S 330  
rRNA then elutes from 9.5 to 11.9 min, 18S rRNA from 331  
12.6 to 14.8 min, and tRNA from 18.0 to 20.0 min (Fig. 5). 332
4. Collect the desired fractions and concentrate them to ~50  $\mu$ L 333  
using a lyophilizer or vacuum concentrator (*see* **Note 16**). 334
5. Add  $\frac{1}{10}$  of the volume of 5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , and then add  $2.5 \times$  of 335  
the volume of ice-cold 100% ethanol (*see* **Note 17**). Precipitate 336  
and resuspend RNA as described in Subheading 3.4. 337

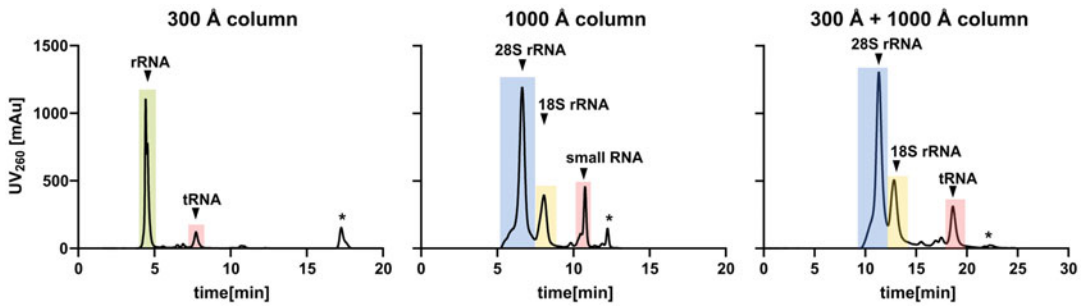


**Fig. 4** Compounds used for stable isotope labeling in cell culture. Structures of <sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uridine (left), <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-adenine (middle), and CD<sub>3</sub>-methionine (right) are shown

### 3.6 RNA Purification by Oligonucleotide Hybridization Assay

Purification of specific RNA types can be done by oligonucleotide hybridization. Our protocol is a variation of a published protocol by the Helm lab [14]. Please see Fig. 6 for an overview of the procedure.

1. A DNA oligonucleotide (ON) of ~30 nucleotides in length with an additional AAA-tail and a biotin tag is designed complementary to the sequence of the target RNA (*see Note 18*). For example, the biotinylated ON used to purify tRNA<sub>Phe</sub> is shown below: [Btm] AAATGGTGCCGAAACCCGGGATC GAACCAGGGT.
2. Equilibrate the beads by transferring 25  $\mu$ L of streptavidin beads T1 (*see Note 19*) for each sample into a 1.5 mL tube (e.g., 200  $\mu$ L for eight samples).
3. Place the tube on a magnetic rack and leave it until the beads are attached to the wall of the tube. Then, carefully aspirate and discard the liquid.
4. Resuspend the remaining beads in 25  $\mu$ L (here: 200  $\mu$ L for eight samples) of B&W buffer and repeat **step 3**. Repeat the wash twice with B&W buffer and then once with SSC buffer (5 $\times$ ). Finally, resuspend the beads in 25  $\mu$ L (here: 200  $\mu$ L for eight samples) SSC buffer (5 $\times$ ).
5. For hybridization of RNA, mix up to 100 pmol of, ideally, size-purified RNA (*see Note 20*) with 100 pmol of ON in SSC buffer (5 $\times$ ) in a final volume of 100  $\mu$ L. For example, mix 20  $\mu$ L total tRNA (or RNA of interest) (75 ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L ON (100  $\mu$ M), 25  $\mu$ L SSC buffer (20 $\times$ ), and 54  $\mu$ L water. Heat the mixture to 90  $^{\circ}$ C for 3 min, and then instantaneously incubate for 10 min at 65  $^{\circ}$ C. Finally, allow the mixture to cool down to room temperature.
6. Transfer 25  $\mu$ L of equilibrated beads into each of the hybridized RNA samples. Mix thoroughly and incubate the samples



**Fig. 5** Elution profiles of total RNA separated by size-exclusion chromatography. For purification, a 300 Å column, a 1000 Å column, or both in combination are used. Small RNA may consist of 5S rRNA, 5.8S rRNA, and tRNA. (\*) indicates common contaminants (small molecules) in RNA samples isolated with TRI Reagent

on a thermomixer for 30–60-min shaking at 600 rpm at room temperature.

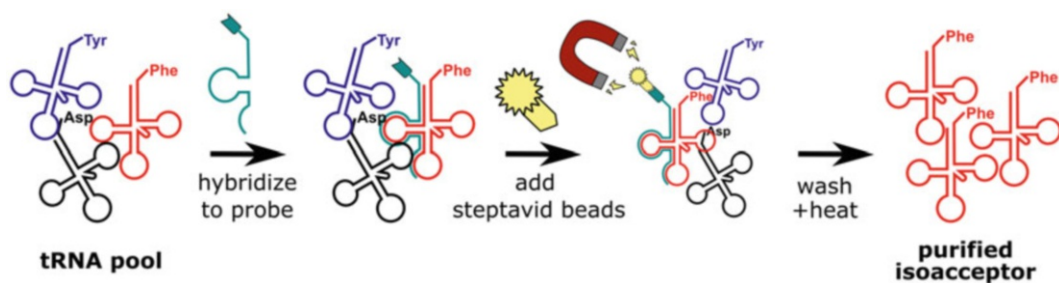
7. To remove unbound RNA, place the sample back on the magnetic rack and repeat **step 3** above. Resuspend the beads in 50 µL SSC buffer (1×). Repeat **step 7** with SSC buffer (0.1×) three times.
8. Finally, resuspend the beads in 10–30 µL water and incubate for 2 min at 75 °C. Subsequently, put the sample on the magnetic rack and transfer the RNA-containing liquid into a new tube.

### 3.7 RNA Digestion and Filtration

1. Dilute up to 1 µg of purified RNA in 20 µL ultrapure water.
2. Freshly prepare a master mix for digestion according to Table 2.
3. Add 15 µL of the master mix to each sample and mix by pipetting up and down.
4. Incubate the samples for 2 h at 37 °C.
5. Add 15 µL of LC-MS buffer (see **Note 21**).
6. Transfer the whole sample volume to a 96-well filter plate (10 kDa MWCO) mounted on a skirted PCR plate (alternatively use single-filter tubes with 10 kDa MWCO; see the manufacturer's manual) and centrifuge for 30 min at 3000 × g and 4 °C (see **Note 22**).
7. Transfer 2.5 µL of SILIS (10×) into LC-MS vials and add 22.5 µL of the digested centrifuged RNA sample (from **step 6**). Mix by pipetting up and down (see **Note 23**).

### 3.8 Calibration

1. For calibration, weigh and dissolve all synthetic nucleosides (Table 1) in water to a stock concentration of 10 mM. Exceptions are G, m<sup>2</sup>G, m<sup>22</sup>G, and Q which are, due to low solubility in water, dissolved to a stock concentration of 1 mM.



**Fig. 6** RNA purification using oligonucleotide hybridization. SEC-purified tRNA is incubated with a biotinylated DNA probe (green) complementary to the tRNA of interest (red). Using streptavidin-coated magnetic beads, the tRNA of interest is purified from total tRNA. This procedure can be applied to other RNA molecules in addition to tRNA

2. To prepare the calibration solutions, first mix and dilute the 401  
desired nucleosides in a final concentration of 100  $\mu\text{M}$  for the 402  
canonical nucleosides and 5  $\mu\text{M}$  for the modified nucleosides 403  
(see **Note 24**). Aliquot the resulting “nucleoside start mix” in 404  
25  $\mu\text{L}$  and store at  $-20^\circ\text{C}$ . 405
3. Prior to usage, thaw one aliquot and dilute 10  $\mu\text{L}$  with 90  $\mu\text{L}$  406  
water. This solution is used for the highest concentration of 407  
calibration (=L12). 408
4. We suggest serial dilution by mixing 50  $\mu\text{L}$  with 50  $\mu\text{L}$  water. 409  
Repeat until 12 solutions with descending concentration are 410  
prepared (L1–L12,  $12\times$ , 1:2 dilution). 411
5. Transfer 2.5  $\mu\text{L}$  of SILIS (10 $\times$ ) into LC-MS vials and add 412  
22.5  $\mu\text{L}$  of calibration solution. Mix by pipetting up and 413  
down. An overview of preparation of calibration solutions and 414  
the resulting chromatogram is shown in Fig. 7. 415

### 3.9 LC-MS/MS Measurement

1. The chromatographic separation of the analytes is implemen- 417  
ted by high-performance liquid chromatography (HPLC). The 418  
separation is performed using a Synergi Fusion-RP 100 Å 419  
2.5  $\mu\text{m}$ ,  $150 \times 2.0$  mm column from Phenomenex with a 420  
gradient elution. 421
2. Regarding the separation of nucleosides on the HPLC we 422  
suggest the following setup: 423

Parameter	Setting	424
Column oven temperature	35 $^\circ\text{C}$	425
Flow rate	0.35 mL/min	426
Aqueous solvent (A)	LC-MS buffer	427
Organic solvent (B)	Pure acetonitrile	428

429

3. The liquid chromatography is run with the following gradient: 430

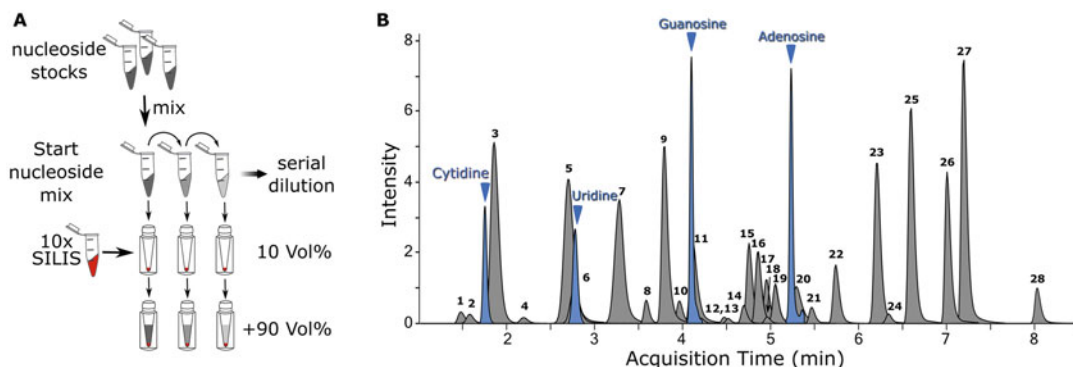
Time	Aqueous solvent (A) LC-MS buffer	Organic solvent (B) Acetonitrile	
0–1 min	100%	0%	431
1–4 min	Decreasing to 90%	Increasing to 10%	432
4–7 min	Decreasing to 60%	Increasing to 40%	433
7–8 min	60%	40%	434
8–11 min	100%	0%	435

4. We suggest optimization of source parameters using a mix of 438  
the four canonical nucleosides. Optimized parameters deter- 439  
mined by our lab using Agilent’s “Source Optimizer” software 440  
are as follows: 441

Parameter	Setting	
Ionization	ESI	442
Ion mode	Positive	443
Skimmer voltage	15 V	444
Cell accelerator voltage	5 V	445
N2 gas temperature	230 °C	446
N2 gas flow rate	6 L/min	447
Sheath gas (N2) temperature	400 °C	448
Sheath gas (N2) flow rate	12 L/min	449
Capillary voltage	2500 V	450
Nozzle voltage	0 V	451
Nebulizer	40 psi	452

5. Continue with the optimization of individual nucleosides. 455  
Implement a product ion scan in order to determine the frag- 456  
mentation of the respective nucleoside. Then continue with the 457  
optimization of fragmentor voltage (50–250 V) and collision 458  
energy (5–25 eV) and the determination of retention times for 459  
every nucleoside of interest with the goal of receiving the high- 460  
est sensitivity possible. This can be conducted manually or with 461  
Agilent’s “Optimizer” software. Optimized parameters for 462  
each nucleoside used in our settings are given in Table 3 (*see* 463  
Note 25). 464

6. Design a dynamic multiple reaction monitoring (dMRM) 465  
method for sample measurement. As the sample contains a 466



**Fig. 7** LC-MS/MS calibration measurement. **(a)** Overview of calibration solution preparation. **(b)** Chromatogram with UV (blue) and MS (black) trace indicating the identity of all peaks. 1: D, 2:  $\Psi$ , 3: C, 4:  $\text{ncm}^5\text{U}$ , 5:  $\text{m}^3\text{C}$ , 6: U, 7:  $\text{m}^1\text{A}$ , 8:  $\text{m}^5\text{C}$ , 9:  $\text{m}^7\text{G}$ , 10: I, 11: G, 12:  $\text{s}^2\text{U}$ , 13: Um, 14:  $\text{m}^3\text{U}$ , 15:  $\text{m}^1\text{I}$ , 16:  $\text{m}^1\text{G}$ , 17: Gm, 18:  $\text{mcm}^5\text{U}$ , 19:  $\text{m}^2\text{G}$ , 20: A, 21:  $\text{t}^6\text{A}$ , 22:  $\text{m}^{22}\text{G}$ , 23: Am, 24:  $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ , 25:  $\text{m}^6\text{A}$ , 26:  $\text{m}^6\text{Am}$ , 27:  $\text{m}^{66}\text{A}$ , 28:  $\text{i}^6\text{A}$

mixture of nucleosides and their isotopologues, determine the precursor ion and product ion for every isotopologue that might occur in your mixture. Then, fill in the optimized parameters for each nucleoside. If you decide to use a retention time window ( $\Delta\text{RT}$ ), determine the  $\Delta\text{RT}$  for each compound. For most modified nucleosides, we suggest a 0.5–1 min  $\Delta\text{RT}$ . Slight changes of pH in the samples might lead to shifted retention times, especially for  $\text{m}^3\text{C}$ ,  $\text{m}^1\text{A}$ , and  $\text{m}^7\text{G}$ . Thus, we recommend a  $\Delta\text{RT}$  of 2–3 min for those.

7. For later analysis using Agilent's "Quantitative Mass Hunter" software it is important to specify every isotopologue by a unique compound name. Additionally, assign every analyte, including SILIS and the isotopologues, to their respective compound group and tick the SILIS box only for the SILIS isotopologue. An example is given in Table 4.

### 3.10 Data Analysis

We analyze data with the quantitative and qualitative MassHunter Software from Agilent. Detailed instruction on how to handle Agilent's MassHunter Workstation Software for Quantitative Analysis is given in their Familiarization Guide which can be found online ([https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3335\\_90061\\_Quant\\_Familiarization-EN.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3335_90061_Quant_Familiarization-EN.pdf)) or in a video on the Kellner lab homepage (<https://www.cup.lmu.de/oc/kellner/>).

1. The areas of the MS signals are integrated for each nucleoside. For the calibration, the values of integrated MS signals from target nucleosides are set in relation to the MS signals of the respective SILIS (*see* **Note 26**) to receive the nucleoside isotope factor (NIF, Eq. (1)):



$$\text{NIF}_{\text{nucleoside}} = \frac{\text{signal area}_{\text{nucleoside}}}{\text{signal area}_{\text{respective SILIS}}} \quad (1)$$

2. Results from Eq. (1) are plotted against the expected molar amount of nucleosides and regression curves are plotted through the data points. The slopes represent the respective relative response factors for the nucleosides (rRFN) and enable an absolute quantification. The plotting of these calibration curves is done automatically by the quantitative MassHunter software and should be checked manually for linearity (*see Note 27*). This principle is outlined in Fig. 8a. The calibration curves measured with the synthetic standards (unlabeled) are used for each isotopologue of the respective compound (*see Note 28*).
3. Molar amounts of nucleosides in samples are then calculated according to Eq. (2) using the signal areas of target compounds and SILIS in the samples and the respective rRFN, determined by calibration measurements. This step is done automatically by the quantitative MassHunter software:

$$n_{\text{sample nucleoside}} = \frac{\text{signal area}_{\text{sample nucleoside}}}{\text{rRFN}_{\text{nucleoside}} \cdot \text{signal area}_{\text{respective SILIS}}} \quad (2)$$

4. To make different samples quantitatively comparable, the molar amount of each modified nucleoside has to be normalized by the molar amount of canonical nucleosides. This can be done by normalizing the molar amount of a single or the sum of canonical nucleosides or by normalizing the molar amount of injected RNA to receive the number of modifications per RNA molecule. Therefore, the calculated amount of injected canonical nucleotides must be divided by their expected occurrence in the respective RNAs and averaged afterwards (Eq. (3)). The numbers for each canonical nucleoside are either taken from known sequences or determined empirically. Figure 8b summarizes the theory of MS quantification. The different isotopologues have to be referenced to their corresponding labeled canonicals (e.g., unlabeled modifications have to be referenced to unlabeled canonicals). An example for the labeled nucleoside m<sup>7</sup>G is shown in Table 5. A quick overview of the principles of absolute quantification in a NAIL-MS experiment is shown in Fig. 8c:

$$n_{\text{tRNA}} = \frac{\frac{n_C}{\#C} + \frac{n_U}{\#U} + \frac{n_G}{\#G} + \frac{n_A}{\#A}}{4} \quad (3)$$

t.1 **Table 3**  
t.2 **Optimized QQQ parameters for nucleosides**

t.2	Compound name	Precursor ion	MS1 Res	Product ion	MS2 Res	Ret time (min)	Delta Ret time	Fragmentor	Collision energy
t.3	A	268.1	Wide	136	Unit	5.2	1	200	20
t.4	ac <sup>4</sup> C	286.1	Wide	154	Unit	5	1	85	9
t.5	acp <sup>3</sup> U	346.1	Wide	214	Unit	2.3	1	95	15
t.6	Am	282.1	Wide	136	Unit	6	1	130	17
t.7	C	244.1	Wide	112	Unit	2.1	1	200	20
t.8	Cm	258.1	Wide	112	Unit	4.1	1	180	9
t.9	D	247.1	Wide	115	Unit	1.6	1	70	5
t.10	G	284.1	Wide	152	Unit	4.3	1	200	20
t.11	Gm	298.1	Wide	152	Unit	5	1	100	9
t.12	I	269.1	Wide	137	Unit	4.1	1	100	10
t.13	i <sup>6</sup> A	336.3	Wide	204	Unit	8	1	140	17
t.14	m <sup>1</sup> A	282.1	Wide	150	Unit	2.2	1.5	150	25
t.15	m <sup>1</sup> G	298.1	Wide	166	Unit	4.9	1	105	13
t.16	m <sup>1</sup> I	283.1	Wide	151	Unit	4.8	1	80	12
t.17	m <sup>1</sup> Ψ	259.0	Wide	223	Unit	3.1	1	85	5
t.18	m <sup>22</sup> G	312.1	Wide	180	Unit	5.7	1	105	13
t.19	m <sup>2</sup> G	298.1	Wide	166	Unit	5.1	1	95	17
t.20	m <sup>3</sup> C	258.1	Wide	126	Unit	2.3	1,5	88	14
t.21	m <sup>3</sup> U	259.1	Wide	127	Unit	4.8	1	75	9
t.22	m <sup>5</sup> C	258.1	Wide	126	Unit	3.8	1	185	13
t.23	m <sup>5</sup> U	259.1	Wide	127	Unit	4.4	1	95	9
t.24	m <sup>66</sup> A	296.0	Wide	164	Unit	7.1	1	130	21
t.25	m <sup>66</sup> Am	310.0	Wide	164	Unit	7.5	1	120	15
t.26	m <sup>6</sup> A	282.1	Wide	150	Unit	6.5	1	125	17
t.27	m <sup>6</sup> Am	296.0	Wide	150	Unit	7	1	125	17
t.28	m <sup>7</sup> G	298.1	Wide	166	Unit	3.6	1	100	13
t.29	mcm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	333.1	Wide	201	Unit	6.2	1	92	8
t.30	ncm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	318.1	Wide	186	Unit	4.2	1	95	7
t.31	mcm <sup>5</sup> U	317.1	Wide	185	Unit	5	1	95	5
t.32	ncm <sup>5</sup> U	302.0	Wide	170	Unit	2.5	1	85	8
t.33	cm <sup>5</sup> U	303.1	Wide	171	Unit	2	1	100	7

(continued)

t.34 **Table 3**  
t.35 **(continued)**

Compound name	Precursor ion	MS1 Res	Product ion	MS2 Res	Ret time (min)	Delta Ret time	Fragmentor	Collision energy
Q	410.2	Wide	295	Unit	4.3	1	115	12
s <sup>2</sup> U	261.1	Wide	129	Unit	4.3	1	80	6
t <sup>6</sup> A	413.1	Wide	281	Unit	5.8	1	130	9
U	245.1	Wide	113	Unit	3	1	95	5
Um	259.2	Wide	113	Unit	4.6	1	96	8
Ψ	245.1	Wide	209	Unit	1.7	1	90	5
ManQ	572.3	Wide	295.5	Unit	3.9	1	120	20
GalQ	572.3	Wide	295.5	Unit	4.1	1	115	20

t.44 Determined by using unlabeled synthetic nucleosides. The same parameters can be applied to labeled nucleosides (with separate compound name) when m/z of precursor and product ions are increased accordingly

**4 Notes**

- 532
- 533
- 534
- 535
- 536
- 537
- 538
- 539
- 540
- 541
- 542
- 543
- 544
- 545
- 546
- 547
- 548
- 549
- 550
- 551
- 552
- 553
- 554
- 555
- 556
1. The first generation of SILIS is suited for quantification of unlabeled RNA samples from, for example, tissue samples. It is produced in the presence of <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>-methionine using <sup>13</sup>C-rich growth medium. Due to the presence of <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-methionine in the <sup>13</sup>C-rich growth medium only 80% of the methyl marks were <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>-labeled while 20% were <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-labeled and thus 2 Da lighter than required for our newly developed cell culture NAIL-MS experiments (Fig. 9). Our second-generation SILIS does not rely on methionine labeling and the successful monoisotopic labeling is shown in Fig. 10.
  2. For example, labeling of purines and the respective modifications in medium A (+5 for adenosines, +4 for guanosines) with a CD<sub>3</sub>-methionine-labeled culture in medium B (+3 for all methylated nucleosides) could potentially lead to difficulties in data acquisition as the resulting isotopologues differ by only 1–2 Da. We recommend one unlabeled culture while the other culture is <sup>15</sup>N-, <sup>13</sup>C-, and D<sub>3</sub>-labeled.
  3. Compared to unlabeled nucleosides, we observe very low MS background signals for labeled nucleosides. Therefore, we recommend starting with unlabeled cells and switch to labeled medium upon initiation of the experiment. We refer to this approach as “forward” experiment. This is important as the abundance of new nucleosides (=labeled in forward) is naturally very low upon experiment initiation.

t.1 **Table 4**  
**Setting of compound groups during dMRM method setup of nucleosides**  
**(here shown for Am)**

t.2	<b>Compound name</b>	<b>Compound group</b>	<b>ISTD</b>
t.3	Am	Am	False
t.4	Am D <sub>3</sub> lab	Am	False
t.5	Am core lab	Am	False
t.6	Am fully lab	Am	False
t.7	Am SILIS	Am SILIS	True

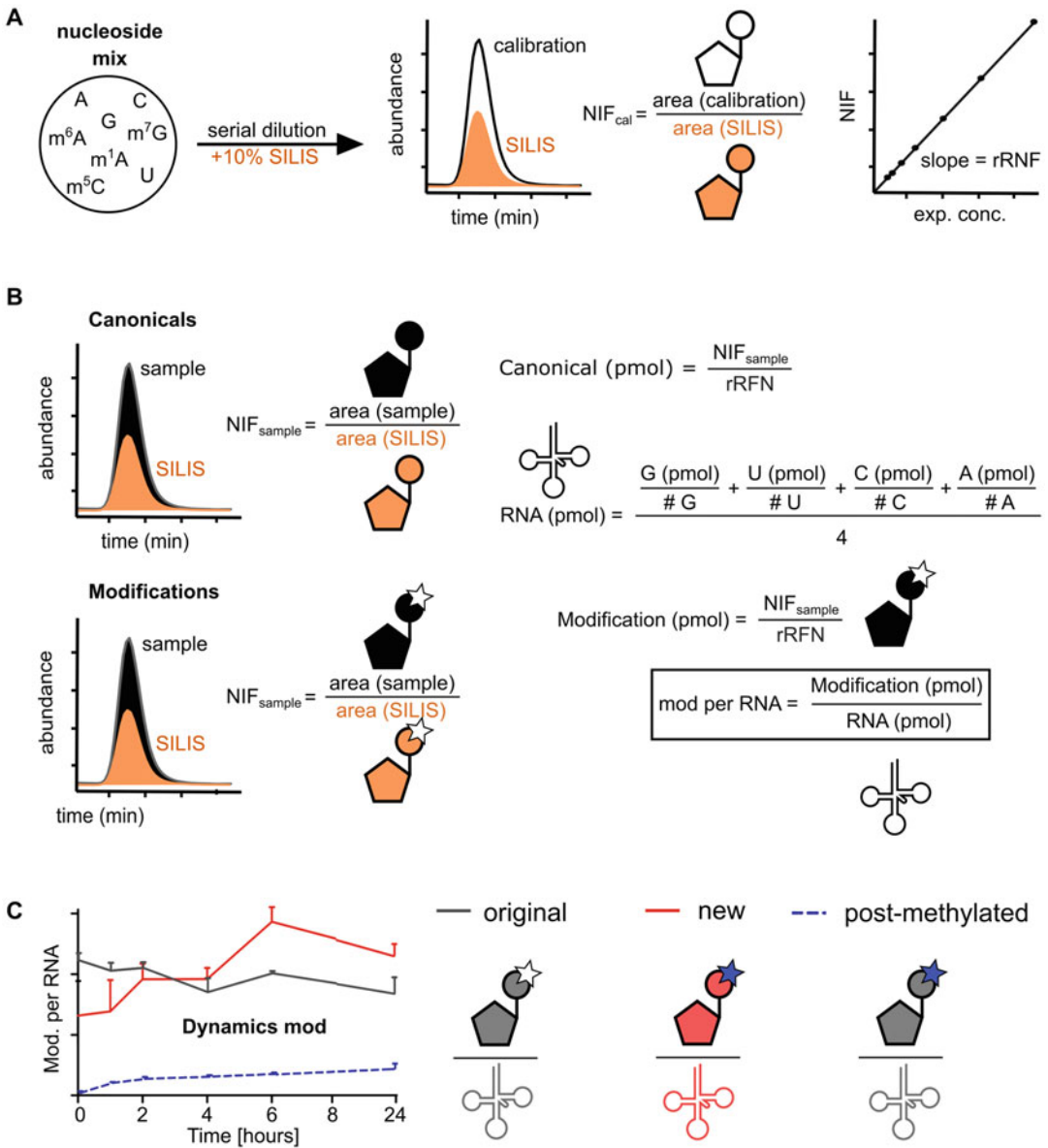
4. Collart et al. [15] suggest storing acidic phenol at 4 °C. We observed diminished extraction efficiency over time, when acidic phenol was stored at 4 °C. Instead we store acidic phenol in aliquots at −20 °C and thaw it directly before use to ensure uniform extraction efficacy.
5. If a NAIL-MS sample shows low signal intensity of the SILIS, the UV detection of theophylline at 260 nm acts as an external standard to rule out potential errors.
6. Instead of DMEM medium, it is possible to use RPMI R0883 or IMDM I3390 if supplemented with the labeled compounds using the same concentrations as for DMEM. As these media are already supplemented with methionine, the complete labeling of methyl groups may not work. For this purpose, choose media that lack methionine. HeLa (in DMEM or RPMI) and HAP (in DMEM or IMDM) cells were also successfully labeled in these media.
7. Labeled adenine is used for the labeling of all purines whereas labeled uridine is used for the labeling of all pyrimidines. Labeled methionine is supplemented if the labeling of SAM-dependent methyl groups is desired. If available, different labeled isotopologues can be used. Keep in mind that all mass

t.1 **Table 5**  
**Quantification of m<sup>7</sup>G per tRNA (based on G)**

AU2

t.2	<b>m<sup>7</sup>G (pmol)</b>	<b>G (pmol)</b>	<b>m<sup>7</sup>G per tRNA</b>
t.3	$\frac{\text{area m}^7\text{G } (^{15}\text{N}, \text{CD}_3)}{\text{rRFN m}^7\text{G} \cdot \text{area m}^7\text{G (SILIS)}}$	$\frac{\text{area G } (^{15}\text{N})}{\text{rRFN G} \cdot \text{area G (SILIS)}}$	$\frac{\text{m}^7\text{G (pmol)}}{\text{G (pmol)}} \cdot \frac{\text{# of G in sequence}}{\text{# of m}^7\text{G in sequence}}$

t.4 First the molar amount of injected nucleosides is calculated based on the signal areas of target nucleosides and SILIS and the respective calibration curves (here for m<sup>7</sup>G and G). These steps are done automatically by the quantitative MassHunter software. Then the molar amount of modification is divided by the molar amount of respective RNA molecules calculated by dividing the molar amount of canonical nucleosides by the expected number (#) of the respective canonical (here based on G)



**Fig. 8** Concepts of absolute quantification by LC-MS/MS. **(a)** Calibration curves are plotted by calculating the NIF of each nucleoside. **(b)** Absolute amounts of canonicals and modifications are calculated by dividing the sample area by the respective SILIS area and by applying the previously determined calibration curves. Modification per tRNA can be calculated by referencing to the injected amount of RNA molecules (based on expected numbers of canonicals). **(c)** Absolute amounts of modifications have to be referenced to the respective labeled canonicals. Thereby original, new, and post-methylated transcripts can be investigated in parallel

transitions potentially differentiate from the ones reported 578  
here. For proper evaluation by MS, all resulting masses should 579  
be more than 2 Da higher than the respective other 580

- isotopologues to ensure that there is no overlap with nucleosides already carrying naturally occurring  $^{13}\text{C}$ -atoms.
8. Instead of quenching medium, the respective growth medium (supplemented with the labeled compounds as desired) can be used. For economic reasons, we suggest using the cheaper quenching medium.
  9. PBS wash is only required if a portion of cells are to be harvested for protein/non-RNA analysis or if a large portion of the cells die during the experiment.
  10. Lysed cells can be stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for up to 1 month.
  11. The harvesting procedure might differ for other cell types, e.g., for yeast.
  12. Precipitation for 1 h is possible but may result in lower quantities. Incubating at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  should be considered for very short precipitation times.
  13. From our experience, thiolated nucleosides and especially wobble uridines are susceptible to degradation upon long-term storage.
  14. The retention time of rRNA subunits from different organisms may be different as a consequence of the subunit's sizes. Also, retention times might shift depending on the operating life of the column. Always inject a test sample for proper evaluation of retention times.
  15. tRNA purification is possible with a  $130\text{ }\text{\AA}$  column [13].
  16. Take care that the RNA is not concentrated to dryness as this might lead to RNA degradation.
  17. Alternatively, co-precipitants (e.g.,  $1\text{ }\mu\text{L}$  of GlycoBlue<sup>TM</sup>) can be added to each sample to facilitate RNA precipitation and simplify washing steps.
  18. CG- or AU-rich sequences and a high number of modifications can alter the necessary melting temperature and may require optimization.
  19. In our experience, all four types of streptavidin-coated Dynabeads<sup>®</sup> can be used. M-270 and M-280 beads require the use of  $50\text{ }\mu\text{L}$  instead of  $25\text{ }\mu\text{L}$  (as used for T1 and C1 beads) per sample.
  20. The use of pre-purified RNA is crucial to avoid unspecific binding of other RNAs with similar sequence motifs which are highly abundant in total RNA preparations.
  21. The addition of LC-MS buffer (pH 5.3) to digested samples (pH 8.0) lowers the pH and improves nucleoside stability, detection efficiency, and retention time reproducibility. However, if the concentration of RNA is very low, it may be considered to skip this step.

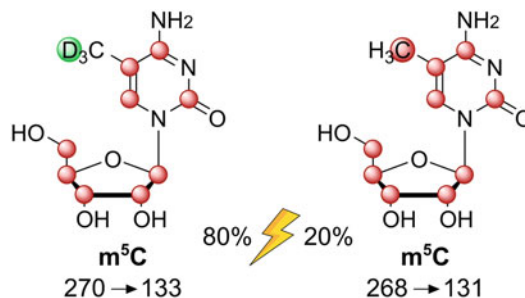
22. Filtration of digested samples is important to avoid contamination of the HPLC with digestion enzymes and particles. However, some filter materials might interact with the nucleosides (e.g., Na<sup>+</sup> adducts) and perturb analysis.
23. Samples should be measured directly after digestion to avoid degradation of unstable modifications such as wobble uridines.
24. These concentrations apply for tRNA analysis. Here, the modified nucleosides D and Ψ might be added in higher concentrations (e.g., 20 μM). For the analysis of different RNA molecules, it may be necessary to change the concentration ratio in order to adapt to the natural-occurring RNA modification density.
25. Most types of RNA have a substantial excess of canonical nucleosides, which would saturate the MS detector at the injection amounts needed for detection of modified nucleosides. Thus, we use nonoptimal MS parameters for all canonical nucleoside isotopologues (e.g., fragmentor voltage or collision energy substantially higher) to artificially impair sensitivity. For analysis of purified RNAs such as tRNA isoacceptors, we recommend using optimal parameters for canonical nucleosides.
26. Assign each isotopologue to its respective SILIS compound. For example, all m<sup>5</sup>C compounds (unlabeled and labeled) should be referenced to the m<sup>5</sup>C SILIS compound.
27. The range of calibration must be wide enough to include the measured concentrations of each isotopologue. Special care should be taken that the calibration curve is linear in each segment that is used for sample analysis. Therefore, calibration points that fall below the lower limit of quantification and higher concentrations that result in detector saturation should be excluded.
28. In Agilent's quantitative MassHunter software navigate to "Tools" > "Actions" > "Copy Calibration Level" in the method adjustment window. This will activate a script which transfers the respective peak areas of the unlabeled calibration compound to each isotopologue which is in the respective compound group (also *see* Table 4). From this timepoint on it is crucial to only quantify the batch if needed. Activating "Analyze batch" results in reversing of the used script to copy calibration curves to each isotopologue.

---

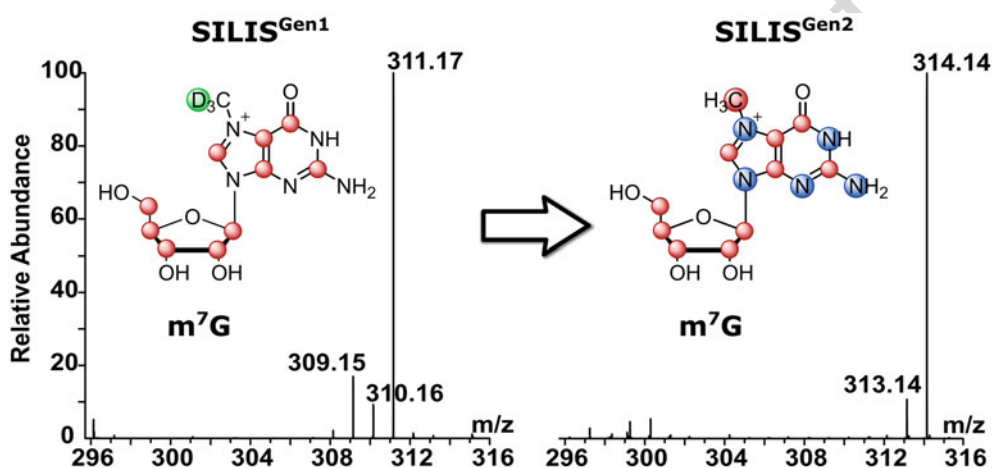
## Acknowledgments

This study was funded through the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KE1943/3-1, KE1943/4-1-SPP1784, and Project-ID 325871075-SFB 1309). We are grateful to Prof. Peter





**Fig. 9** Incomplete labeling of SILIS<sup>Gen1</sup>. Desired labeling of SILIS<sup>Gen1</sup> (80%) (left) and undesired labeling of SILIS<sup>Gen1</sup>, where the methyl groups are <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>- instead of <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>-labeled (20%) (right)



**Fig. 10** Improvement of defined labeling of methylated nucleosides in SILIS<sup>Gen2</sup>. SILIS<sup>Gen1</sup> was labeled using <sup>13</sup>C Silantes-rich growth medium supplemented with <sup>13</sup>C-glucose and CD<sub>3</sub>-methionine which led to incomplete labeling of methylated nucleosides (left). SILIS<sup>Gen2</sup> was labeled using <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N Silantes-rich growth medium supplemented with <sup>13</sup>C-glucose where all respective atoms are <sup>13</sup>C- or <sup>15</sup>N-labeled (right)

Dedon, Prof. Mark Helm, and Prof. Thomas Carell for generous donation of synthetic standards of modified nucleosides.

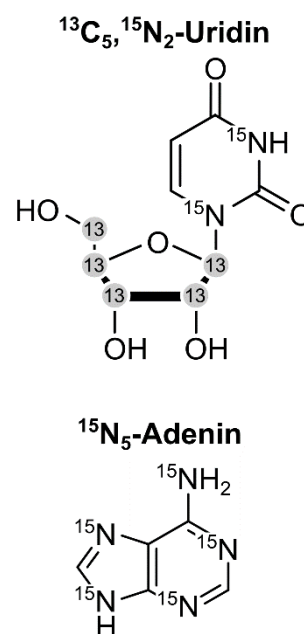
## References

- Heiss M, Kellner S (2016) Detection of nucleic acid modifications by chemical reagents. RNA Biol 0. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1261788>
- Motorin Y, Helm M (2019) Methods for RNA modification mapping using deep sequencing: established and new emerging technologies. Genes (Basel) 10(1). <https://doi.org/10.3390/genes10010035>
- Helm M, Lyko F, Motorin Y (2019) Limited antibody specificity compromises epitranscriptomic analyses. Nat Commun 10 (1):5669. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13684-3>
- Brandmayr C, Wagner M, Bruckl T, Globisch D, Pearson D, Kneutinger AC, Reiter V, Hienzsch A, Koch S, Thoma I, Thumbs P, Michalakakis S, Muller M, Biel M, Carell T (2012) Isotope-based analysis of modified tRNA nucleosides correlates modification density with translational efficiency. Angew

- Chem Int Ed Engl 51(44):11162–11165. <https://doi.org/10.1002/anie.201203769>
5. Kellner S, Ochel A, Thuring K, Spenkuch F, Neumann J, Sharma S, Entian KD, Schneider D, Helm M (2014) Absolute and relative quantification of RNA modifications via biosynthetic isotopomers. *Nucleic Acids Res* 42(18):e142. <https://doi.org/10.1093/nar/gku733>
  6. Thuring K, Schmid K, Keller P, Helm M (2017) LC-MS analysis of methylated RNA. *Methods Mol Biol* 1562:3–18. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6807-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6807-7_1)
  7. Borland K, Diesend J, Ito-Kureha T, Heissmeyer V, Hammann C, Buck AH, Michalakakis S, Kellner S (2019) Production and application of stable isotope-labeled internal standards for RNA modification analysis. *Genes* (Basel) 10(1). <https://doi.org/10.3390/genes10010026>
  8. Reichle VF, Petrov DP, Weber V, Jung K, Kellner S (2019) NAIL-MS reveals the repair of 2-methylthiocytidine by AlkB in *E. coli*. *Nat Commun* 10(1):5600. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13565-9>
  9. Heiss M, Reichle VF, Kellner S (2017) Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS. *RNA Biol* 14(9):1260–1268. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1325063>
  10. Heiss M, Hagelskamp F, Kellner S (2020) Cell culture NAIL-MS allows insight into human RNA modification dynamics in vivo. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.067314>
  11. Thumbs P, Ensfelder TT, Hillmeier M, Wagner M, Heiss M, Scheel C, Schon A, Muller M, Michalakakis S, Kellner S, Carell T (2020) Synthesis of galactosyl-queuosine and distribution of hypermodified Q-nucleosides in mouse tissues. *Angew Chem Int Ed Engl*. <https://doi.org/10.1002/anie.202002295>
  12. Chionh YH, Ho CH, Pruksakorn D, Ramesh Babu I, Ng CS, Hia F, McBee ME, Su D, Pang YL, Gu C, Dong H, Prestwich EG, Shi PY, Preiser PR, Alonso S, Dedon PC (2013) A multidimensional platform for the purification of non-coding RNA species. *Nucleic Acids Res* 41(17):e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt668>
  13. Hagelskamp F, Borland K, Ramos J, Hendrick AG, Fu D, Kellner S (2020) Broadly applicable oligonucleotide mass spectrometry for the analysis of RNA writers and erasers in vitro. *Nucleic Acids Res* 48(7):e41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa091>
  14. Hauenschild R, Tserovski L, Schmid K, Thuring K, Winz ML, Sharma S, Entian KD, Wacheul L, Lafontaine DL, Anderson J, Alfonzo J, Hildebrandt A, Jaschke A, Motorin Y, Helm M (2015) The reverse transcription signature of N-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent. *Nucleic Acids Res* 43(20):9950–9964. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv895>
  15. Collart MA, Oliviero S (2001) Preparation of yeast RNA. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 13: Unit13 12. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1312s23>

### 3.1.1 Uniformität der Isotopenmarkierung

Eine Grundvoraussetzung für die Funktionalität von NAIL-MS in Zellkultur ist die Deaktivierung der *de novo* Nukleotid-Biosynthese. HEK-293-Zellen, sowie die meisten anderen Zellkultursysteme, verfügen über einen Biosyntheseapparat welcher Metaboliten wie CO<sub>2</sub>, Glutamin, Aspartat, Glycin, Formiat und Glukose benötigt, um Nukleotide biosynthetisch selbst herzustellen (**Abbildung S1**). Diese werden anschließend als Grundbausteine der RNA-Moleküle und der entsprechenden Modifikationen verwendet. Die Biosynthese vieler dieser Metaboliten bedient sich wiederum verschiedenster anderer Zellmetaboliten und Nährstoffe wodurch ein komplexes System aufgebaut wird. Die Substitution aller Inhaltsstoffe eines Zellkulturmediums durch ausschließlich isotopenmarkierte Nährstoffe, um dadurch vollständige Isotopenmarkierung aller Nukleotide zu erhalten, ist aufgrund der Komplexität von Zellkulturmedien nicht realisierbar. Zudem ist die Supplementierung von fetalem Rinderserum (engl.: fetal bovine serum, FBS) für die meisten Zellkultursysteme und Medien vorhergesehen. FBS ist ein Naturstoffgemisch und setzt sich daher ebenfalls aus unmarkierten Nährstoffen wie Serumproteinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, aber auch kleinen Metaboliten zusammen. Während in den letzten Jahren vermehrt an biosynthetischen Alternativen mit definierter Zusammensetzung geforscht wurde, wird der Einsatz dieser, trotz positiver Berichte<sup>274, 275</sup> noch mit Skepsis betrachtet. Um trotz Zugabe von FBS – und des daraus resultierenden nicht kontrollierbaren Nährstoffgemischs in Zellkulturmedien – eine einheitliche Isotopenmarkierung der Nukleotide zu erhalten, wurde eine Suppression der *de novo* Nukleotid-Biosynthese angestrebt. Die Supplementierung des Nukleosids (<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-)Uridin und der Nukleobase (<sup>15</sup>N<sub>5</sub>-)Adenin im Medium hat sich für diese Aufgabe als ideal herausgestellt (**Abbildung 3.1**). Zur Isotopenmarkierung von Methylgruppen wurde <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-Methionin (D<sub>3</sub>-Methionin) verwendet.

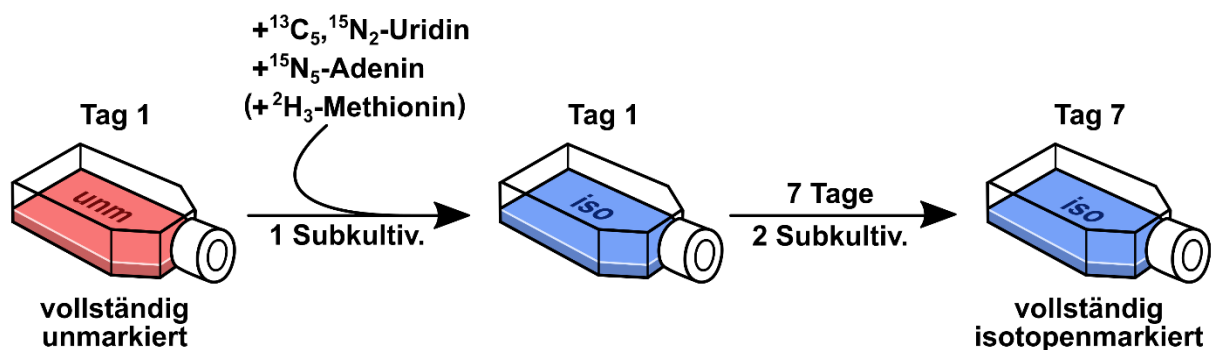


**Abbildung 3.1: Isotopenmarkierung von Uridin und Adenin.**

Für vollständige Isotopenmarkierung aller Nukleoside in RNA-Molekülen wurden Zellen vor Aufreinigung der RNA über eine Dauer von 7 Tagen in isotopenmarkiertem Medium kultiviert (**Abbildung 3.2**). Wie schon in Heiss *et al.* (*Nat. Comm.*, **2021**) durch hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) gezeigt, sind in der zu Nukleosidebene verdauten Probe kaum noch unmarkierte Nukleoside vorhanden. Da die *de novo* Nukleotid-Biosynthese von im Zellkulturme-

### 3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen

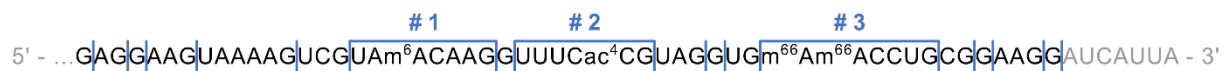
dium vorhandenen unmarkierten Metaboliten abhängig ist, kann anhand dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die *de novo* Biosynthese durch die Zugabe von Uridin und Adenin ganz oder zumindest größtenteils deaktiviert wird. Der minimale Anteil an verbleibenden, unmarkierten Nukleosiden kann auf das Vorhandensein langlebiger RNA-Moleküle<sup>276</sup> (z.B.: rRNA) von Zellen, welche bereits vor dem Start der Isotopenmarkierung vorlagen, erklärt werden. Außerdem wird vom Hersteller eine Isotopenreinheit von 96–98 % für  $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Urididin und  $^{15}\text{N}_5$ -Adenin angegeben, wodurch ebenfalls eine minimale Menge unmarkierter Nukleoside vorhanden sein könnte. Eine weitere Erklärung für die Präsenz unmarkierter Nukleoside wäre die Wiederverwendung von bereits in RNA-Molekülen eingebauten Nukleosiden, die von der Zelle rückgewonnen und anschließend für die Biosynthese neuer RNA-Moleküle verwendet werden. Greifen die Zellen nicht ausschließlich auf die zugeführten Isotopen-Varianten von Adenin und Uridin zurück, kann es somit vorkommen, dass Oligonukleotide entstehen, welche sowohl aus unmarkierten als auch isotopenmarkierten Nukleosiden aufgebaut sind. Dies hätte eine Verzerrung insbesondere bei „Pulse-Chase“-Experimenten zufolge, da vor Allem zu Beginn der „Chase“-Phase neu synthetisierte RNA-Moleküle nicht von originalen, bereits existierenden RNA-Molekülen unterschieden werden können.



**Abbildung 3.2: Vorgehensweise zur vollständigen Isotopenmarkierung aller Nukleoside in RNA-Molekülen.** Subkultiv. = Subkultivierungen

Um sowohl die *de novo* Nukleotid-Biosynthese, als auch die Rückgewinnung und den Wiedereinbau von originalen Nukleosiden als Fehlerquelle auszuschließen, wurde ein natives RNA-Fragment aufgereinigt und auf dessen Isotopenverteilung untersucht. Eine Voraussetzung an das gewählte Oligonukleotid ist die Möglichkeit der eindeutigen Zuordnung: Eine identische Sequenz sollte im Rest des Transkriptoms nicht vorhanden sein. Um zusätzlich die Untersuchung der Auswirkung von Isotopenmarkierung auf Modifikationen zu ermöglichen, wurde ein 46-mer am 3'-Ende der 18S rRNA gewählt. Dieses enthält die Modifikationen  $\text{m}^6\text{A}$ ,  $\text{m}^{66}\text{A}$  und  $\text{ac}^4\text{C}$  (**Abbildung 3.3**). Für die Analyse durch hochauflösende Massenspektrometrie ist ange-

sichts der resultierenden, höheren Sensitivität eine Aufreinigung der gewählten Sequenz sinnvoll. Nach Aufreinigung der 18S rRNA über Größenausschlusschromatographie (SEC) sollte das Oligonukleotid über das Mung-Bean-Nuklease(MBN)-System aufgereinigt werden. Diese Methode beruht auf der Hybridisierung der gewünschten Sequenz mit einem revers komplementären DNA-Oligonukleotid und anschließendem Verdau von einzelsträngiger, also nicht hybridisierter RNA durch MBN. Nach anfänglichen Schwierigkeiten im Prozess der Aufreinigung konnte ein vielversprechendes Protokoll, welches in **Kapitel 5.3 Biochemische Methoden** beschrieben wird, etabliert werden.



**Abbildung 3.3: Sequenz des zu analysierenden Oligonukleotids aus 18S rRNA.** Die gezeigte Sequenz befindet sich am 3'-Ende der 18S rRNA Untereinheit und wurde zur Überprüfung des Wiedereinbaus von bereits verwendeten Nukleosiden (unmarkiert) in neue RNA-Moleküle (isotopenmarkiert) verwendet. Das für die MBN-Methode nötige DNA-Oligonukleotid ist revers komplementär zum in schwarz geschriebenen Sequenzabschnitt. Blaue Linien zwischen den Nukleosiden zeigen die Schnittstellen von RNase T1 an (nach jedem Guanotin). Blaue Kästen (#1, #2 und #3) heben die drei Oligonukleotide hervor, die durch hochauflösende Massenspektrometrie analysiert werden sollten.

Die erfolgreiche Aufreinigung der Sequenz wurde durch absolute Quantifizierung der Nukleoside mittels Nukleosid-MS überprüft. Das gemessene Modifikationsprofil wurde mit dem zu erwartenden verglichen (**Tabelle 3.1**). Als Kontrolle diente aufgereinigte, nicht mit MBN behandelte 18S rRNA. Gezeigt werden lediglich Modifikationen, die im durch MBN aufgereinigten Oligonukleotid detektiert wurden. Weitere Modifikationen, die in der intakten 18S rRNA Untereinheit quantifiziert wurden, sind im **Kapitel 3.5.3 Allgemeine Modifikations-Studien** zusammengefasst.

Bei der Gegenüberstellung der Daten vor und nach Anwendung des MBN-Verdau fällt auf, dass das gemessene Modifikationsprofil dem zu erwartenden eher entspricht, wenn auf den MBN-Verdau verzichtet wird. Der Anteil an quantifizierter ac<sup>4</sup>C-Modifikation entspricht im Verdau von intakter 18S rRNA 106% und befindet sich somit nahe am Erwartungswert. Im durch MBN verdauten Oligonukleotid ist dieser Wert mit 15% weitaus geringer. Anzumerken ist, dass in 18S rRNA insgesamt zwei Positionen berichtet wurden, an denen eine ac<sup>4</sup>C-Modifikation inkorporiert wird. In der Sequenz nach MBN-Verdau ist nur eine dieser Positionen enthalten. Die Menge an m<sup>6</sup>A entspricht in 18S rRNA 70% des zu erwartenden Wertes. Im durch MBN verdauten Oligonukleotid beträgt diese nur 49%. Die Unterschiede können dabei durch den MBN-Verdau selbst herbeigeführt werden. Dieser besteht aus mehreren Schritten,

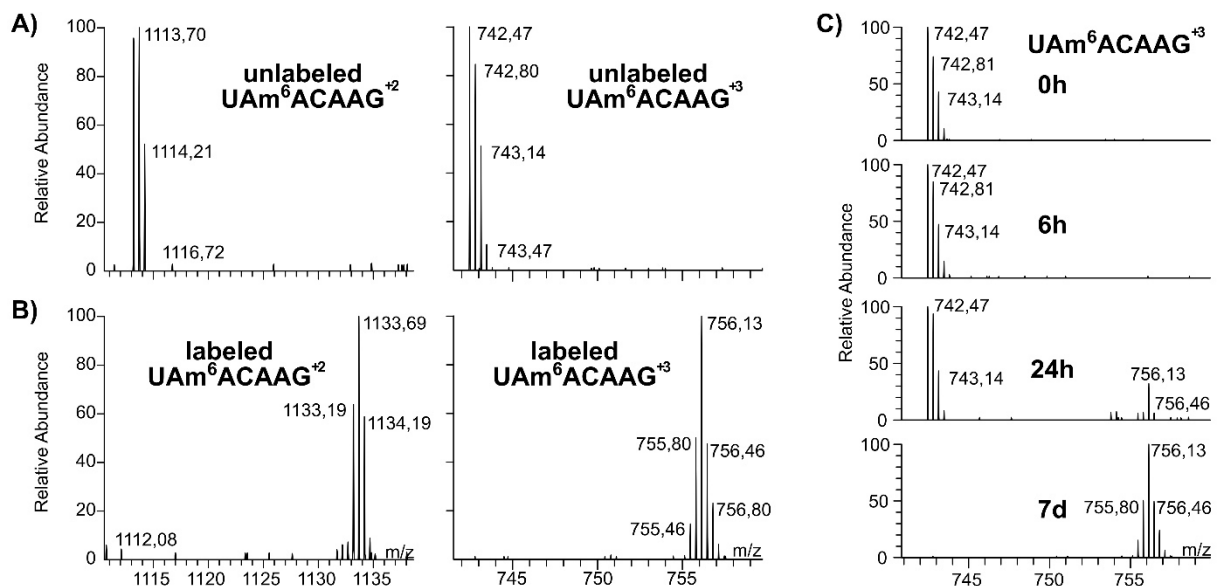
und ist somit vergleichsweise fehleranfällig. So ist es beispielsweise möglich, dass die Hybridisierung des DNA-Oligonukleotids an die Zielsequenz durch vorhandene Modifikationen erschwert wird. Das Resultat wäre eine präferierte Aufreinigung von unmodifizierten RNA-Sequenzen. Ebenso ist es möglich, dass die Menge an aufgereinigtem Material nach dem MBN-Verdau selbst für QQQ-Messung zu gering ist. Das Ergebnis könnte daher aufgrund zu geringer Signal-Intensitäten durch Hintergrundrauschen verzerrt sein.

**Tabelle 3.1: Anteil an quantifizierten Modifikationen im MBN-Verdau und 18S rRNA.** Die Menge an jeweiliger Modifikation pro Molekül wurde für den MBN-Verdau und intakte 18S rRNA über Massenspektrometrie bestimmt (gemessen) und mit den in der Literatur publizierten Werten (berichtet) verglichen. Der Quotient aus beiden Werten gibt den prozentualen Anteil der berichteten Modifikation im jeweiligen Molekül an (%).

	MBN Verdau			18S rRNA		
	gemessen	berichtet <sup>277</sup>	%	gemessen	berichtet <sup>277</sup>	%
m <sup>6</sup> A	1,93	1,88	<b>103</b>	1,70	1,88	<b>90</b>
m <sup>6</sup> A	0,49	1,00	<b>49</b>	0,70	1,00	<b>70</b>
ac <sup>4</sup> C	0,15	1,00	<b>15</b>	1,90	1,80	<b>106</b>

Im nächsten Schritt wurde die Qualität eines RNase-T1-Verdaus von intakter 18S rRNA mit der Qualität eines RNase-T1-Verdaus des durch MBN verdauten Oligonukleotids verglichen. Für beide konnten durch hochauflösende Massenspektrometrie spezifische Oligonukleotide nachgewiesen werden. Am prominentesten war das 7-mer #1, welches die m<sup>6</sup>A-Modifikation trägt (**Abbildung 3.4 A**). Dieses konnte sowohl im +2 als auch im +3 Ladungszustand detektiert werden. Das Oligonukleotid #2 konnte mit weitaus geringerer Intensität ebenfalls nachgewiesen werden. Die Detektion des Oligonukleotids #3, welches zwei m<sup>6</sup>A-Modifikationen trägt blieb erfolglos. Die Detektion zweier zu erwartender Oligonukleotide im MBN-Verdau zeugt von zumindest teilweisem Erfolg der Aufreinigung. Das gesuchte Oligonukleotid #1 konnte auch im RNase-T1-Verdau intakter 18S rRNA detektiert werden. Dort lieferte es, trotz der höheren Komplexität der Probe, ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Aufgrund der geringeren Fehleranfälligkeit wurden weiterführende Experimente daher mit intakter 18S rRNA durchgeführt und auf die weitere Optimierung des MBN-Verdaus im Zuge dieser Arbeit verzichtet.

Nach erfolgreicher Detektion der spezifischen Oligonukleotide sollte der Effekt der Isotopenmarkierung auf ebendiese untersucht werden. Zellen wurden über eine Dauer von 7 Tagen in isoto­penmarkiertem Medium kultiviert ( $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Uridin,  $^{15}\text{N}_5$ -Adenin und  $\text{D}_3$ -Methionin). Anschließend wurde die 18S rRNA über SEC aufgereinigt, durch RNase T1 zu Oligonukleotiden verdaut und über HRMS analysiert. Das Oligonukleotid #1 konnte mit dem durch die Isotopenmarkierung zu erwartenden Massenanstieg detektiert werden (**Abbildung 3.4 A/B**). Um den Wiedereinbau von bereits zuvor verwendeten Nukleosiden in diesem Oligonukleotid auszuschließen wurde ein „Pulse-Chase“-Experiment durchgeführt. Zellen wurden in unmarkiertem Medium kultiviert bevor bei einer Konfluenz von etwa 70% auf isoto­penmarkiertes Medium gewechselt wurde. Während nach 6 h noch kein Oligonukleotid neuer (isotopenmarkierter) 18S rRNA detektiert werden konnte, war nach 24 h ein eindeutiges Signal erkennbar (**Abbildung 3.4 C**). Trotz erheblicher Menge an neu synthetisierter rRNA nach 24h, konnte kein Oligonukleotid, welches einen gemischten Aufbau von isoto­penmarkierten und unmarkierten Nukleosiden aufweist, detektiert werden. Dies spricht gegen den Wiedereinbau bereits genutzter Nukleotide für die Biosynthese neuer rRNA-Moleküle. Wie zu erwarten kann nach 7 Tagen Kultivierung in isoto­penmarkiertem Medium fast ausschließlich das isoto­penmarkierte Oligonukleotid nachgewiesen werden. Für das unmarkierte Oligonukleotid konnte nahezu kein Signal detektiert werden.



**Abbildung 3.4: HRMS nach RNase T1 Verdau von 18S rRNA.** Die 18S rRNA Untereinheit wurde aufgereinigt und mit RNase T1 zu Oligonukleotiden verdaut. Gezeigt sind Massenspektren von (A) unmarkierter 18S rRNA und (B) isoto­penmarkierter 18S rRNA. Gezeigt ist jeweils ein zweifach und dreifach geladenes Kation des prominentesten Oligonukleotids. Alle Zellen wurden 7 Tage im entsprechenden Medium kultiviert. (C) HRMS Spektren des zeitlichen Verlaufs nach Mediumwechsel von unmarkiertem zu isoto­penmarkiertem Medium.



### 3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen

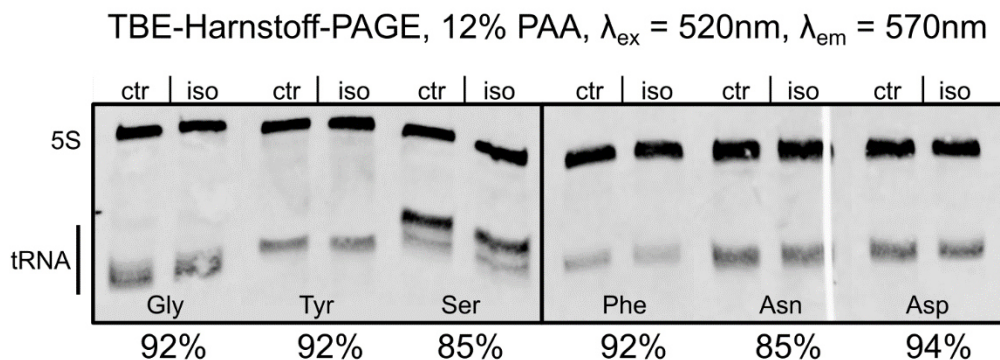
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Wiedereinbau bereits von der Zelle verwendeter Nukleotide in neu entstehende RNA-Moleküle nicht nachweisbar ist. Eine direkte Durchmischung des originalen und neuen Nukleotid-Bestands scheint nicht stattzufinden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass andere Sequenzbereiche des rRNA-Moleküls eine abweichende Isotopenmarkierung aufweisen. In der untersuchten Sequenz traten für die gewählten Zeitpunkte keine RNA Oligonukleotide auf, welche sowohl aus unmarkierten als auch isotonenmarkierten Nukleosiden aufgebaut sind. Eine zusätzliche Untersuchung des Isotopenmusters nach zwei bis vier Tagen erscheint sinnvoll. Für weiterführende Untersuchungen anhand von NAIL-MS sollte diese Validierung für tRNA-Moleküle und falls möglich auch andere RNA-Moleküle wie bspw. mRNA durchgeführt werden. Da die Kinetik des Auf- und Abbaus dieser RNA-Moleküle teils stark von dem der 18S rRNA abweicht sind Unterschiede im Ergebnis nicht auszuschließen. Die Aufreinigung über das Mung-Bean-Nuklease System sollte weiter optimiert werden, um die Sensitivität für niedrig abundante RNA-Moleküle zu erhöhen.

### 3.1.2 Einfluss von NAIL-MS auf tRNA-Isoakzeptoren (Northern-Blotting)

In Heiss *et al.* (*Nat. Comm.*, 2021) wurde der Einfluss von NAIL-MS auf tRNA, dort explizit für  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{GAA}}$  gezeigt. Äquivalente Studien wurden für  $\text{tRNA}^{\text{His}}_{\text{GUG}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{GUA}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}_{\text{GUU}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Asp}}_{\text{GUC}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Gly}}_{\text{GCC}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$  durchgeführt.

Anhand von Northern-Blotting wurde die Abhängigkeit der Abundanz der tRNA-Moleküle von der Isotopenmarkierung analysiert. Zellen wurden in unmarkiertem oder isotopenmarkiertem ( $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Uridin,  $^{15}\text{N}_5$ -Adenin und  $\text{D}_3$ -Methionin) Medium kultiviert und nach 7 Tagen geerntet. Die gesamte RNA wurde aufgereinigt und über Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Membran wurde jeweils unmarkierte und isotopenmarkierte 5S rRNA zusammen mit dem jeweiligen tRNA-Isoakzeptor durch die eigens hierfür synthetisierten DNA-Sonden nachgewiesen (~30mer DNA-Oligonukleotide gekoppelt mit dem Cyanin-Farbstoff Cy3). 5S rRNA diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung bei der Berechnung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz verwendet.

Alle tRNA-Moleküle weisen eine geringe Reduzierung der Abundanz in isotopenmarkiertem Medium auf (**Abbildung 3.5**). Während die tRNA-Isoakzeptoren  $\text{tRNA}^{\text{Gly}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Asp}}$  eine Reduzierung um 6–8 % aufweisen, sind es bei  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$  15 %. Eine erneute Durchführung der Gelelektrophorese lieferte vergleichbare Resultate. Die Bande von  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$  läuft geringfügig höher als die restlichen tRNA-Isoakzeptoren. Dies ist auf die



**Abbildung 3.5: Northern Blot Analyse unmarkierter und isotopenmarkierter tRNA-Isoakzeptoren.** In beiden Medien wurden Adenin, Uridin und Methionin jeweils als entsprechendes Isotopolog zugegeben (ctr = unmarkiert, iso = isotopenmarkiert). Nach Extraktion der Gesamt-RNA wurden jeweils 1,3  $\mu\text{g}$  geladen, über PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte über komplementäre DNA-Sonden an die jeweils an beiden Enden ein Cyanin-Farbstoff (Cy3) gekoppelt wurde ( $\lambda_{\text{ex}}$  = Anregungswellenlänge,  $\lambda_{\text{em}}$  = Emissionswellenlänge). Die obere Bande repräsentiert jeweils 5S rRNA, die untere Bande den ausgewiesenen tRNA-Isoakzeptor. Die Intensität der Banden wurde quantifiziert und daraus die Abundanz in isotopenmarkiertem Medium berechnet. Diese ist als Prozentzahl unter den jeweiligen tRNA-Isoakzeptoren angegeben.

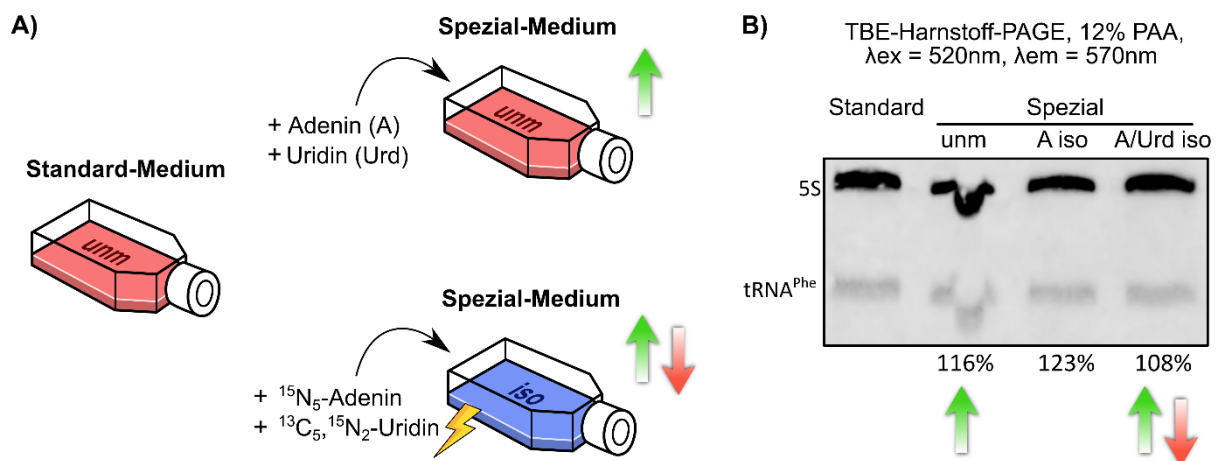
Länge der variablen Schleife zurückzuführen, welche in tRNA<sup>Ser</sup> aus deutlich mehr Nukleosiden besteht. Ein Grund für die geringe Abweichung zwischen den publizierten Daten von tRNA<sup>Phe</sup> (98 %) und den hier gezeigten (92 %) könnte darin liegen, dass die Zellen bei Durchführung des Experiments jeweils eine unterschiedliche Passagenzahl durchlaufen hatten. Abhängig von der Passagenzahl kann die Transkriptionsrate von tRNA-Isoakzeptoren, aber auch von anderen RNA-Molekülen verschieden sein. Die Zugabe isotoopenmarkierter Metabolite könnte diesen Effekt verstärken und somit zur Diskrepanz zwischen den publizierten und den hier gezeigten Daten führen.

Anders als im hier gezeigten Experiment, wurde für die Datenerhebung der unmarkierten Zellen in der Publikations-Studie Standard-Medium (DMEM D6546) verwendet. Dieses wird mit normalem FBS (nicht dialysiert) supplementiert. Bei Standard-Medium wurde auf die Zugabe von Adenin und Uridin verzichtet. Die entsprechend isotoopenmarkierten Zellen wurden in Spezial-Medium (DMEM D0422) kultiviert, welches mit dialysiertem FBS und den entsprechenden Isotopologen von Uridin, Adenin und Methionin supplementiert wird. Dieser Ansatz sollte sicherstellen, dass weder die allgemeine Verwendung des Spezial-Mediums, noch die Zufütterung der isotoopenmarkierten Präparate einen Einfluss auf die die Transkriptionsrate von tRNA-Molekülen haben.

Die Zugabe von Uridin und Adenin im Spezial-Medium könnte einen Anstieg der Transkriptionsrate von tRNA hervorrufen. Die isotoopenmarkierte Variante von Uridin konnte laut Hersteller allerdings nicht vollständig von einem der Edukte getrennt werden konnte. Diese Verunreinigung wurde vom Hersteller mit ~ 20 % angegeben. Stocklösungen gleicher Konzentrationen (ermittelt über Einwaage, Isotoopenmarkierung berücksichtigt) von unmarkiertem und isotoopenmarkiertem Uridin wurden über Massenspektrometrie verglichen. Die Intensität des Signals für isotoopenmarkiertes Uridin betrug lediglich 71 % der Intensität des unmarkierten Isotopologs. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die unbekannte Verunreinigung bis zu 29 % beträgt. Dies führt zu geringeren Konzentrationen von isotoopenmarkiertem Uridin im Zellkulturmedium und schleppt zusätzlich die unbekannte Verunreinigung ein. Eine molekulare Antwort der Zelle könnte eine entsprechende Regulierung der tRNA-Transkription sein. Der potenzielle Anstieg der tRNA-Transkriptionsrate würde durch Zugabe von Uridin und Adenin in Spezial-Medium immer auftreten. Durch die Verunreinigung von isotoopenmarkiertem Uridin könnte der Anstieg der tRNA-Transkriptionsrate in isotoopenmarkiertem Medium jedoch gedrosselt werden (**Abbildung 3.6 A**).

Wird nun die tRNA-Transkriptionsrate der Zellen in Standard-Medium mit der tRNA-Transkriptionsrate von Zellen aus isotoopenmarkiertem Spezial-Medium verglichen, wiegen sich die Effekte der Supplementierung der isotoopenmarkierten Varianten von Adenin und Uridin gegeneinander auf. Wie in der Publikation gezeigt, ist kein Unterschied in der Transkriptionsrate von tRNA<sup>Phe</sup> zu erkennen. Werden isotoopenmarkierte Zellen allerdings mit in unmarkiertem Spezial-Medium kultivierten Zellen verglichen, tritt in beiden Kulturen der Effekt der Adenin- und Uridin-Zufütterung ein. Im Medium der isotoopenmarkierten Zellen wird jedoch eine geringere Konzentration an Uridin und die unbekannte Verunreinigung supplementiert. Somit entsteht eine Herabregulation der tRNA-Transkriptionsrate in isotoopenmarkierten Zellen gegenüber unmarkierten, wie sie in **Abbildung 3.5** detektiert wurde. Die Abundanz von 5S rRNA wird in diesem Szenario nicht, oder nur geringfügig durch die Zugabe von Uridin und Adenin reguliert. Die Biosynthese von 5S rRNA ist streng an die Biosynthese der anderen ribosomalen Untereinheiten gekoppelt.<sup>278</sup> Eine unveränderte Transkriptionsrate der 5S rRNA Untereinheit ist daher wahrscheinlich.

Zur Überprüfung obengenannter Hypothese wurden Zellen parallel in allen drei Medien-Varianten kultiviert und die tRNA-Transkriptionsrate über Northern-Blot-Analytik verglichen. Zusätzlich wurden Zellen in Spezial-Medium kultiviert, welches mit isotoopenmarkiertem Adenin



**Abbildung 3.6: Hypothese (A) und Ergebnis (B) des Einflusses von Adenin und Uridin auf die tRNA-Transkriptionsrate.** Standard-Medium = DMEM D6545 + normales FBS, Spezial-Medium = DMEM D0422 + dialysiertes FBS + Adenin + Uridin, unm = unmarkiert, iso = isotoopenmarkiert. 1,3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden über PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte über komplementäre DNA-Sonden an die jeweils an beiden Enden ein Cyanin-Farbstoff (Cy3) gekoppelt wurde ( $\lambda_{\text{ex}}$  = Anregungswellenlänge,  $\lambda_{\text{em}}$  = Emissionswellenlänge). Die Intensität der Banden wurde quantifiziert und daraus die Abundanz gegenüber Standard-Medium berechnet. Diese ist als Prozentzahl angegeben.

aber unmarkiertem Uridin supplementiert wurde. Im Vergleich zu Standard-Medium ist in unmarkiertem Spezial-Medium ein Anstieg der tRNA<sup>Phe</sup>-Abundanz auf 116 % zu verzeichnen (**Abbildung 3.6 B**). Anzumerken ist, dass die Bande der unmarkierten Probe aus Spezial-Medium Ungleichmäßigkeiten aufweist. Dies könnte zu einem Fehler in der Quantifizierung führen. Bei der Verwendung von isotoopenmarkiertem Adenin und unmarkiertem Uridin wird ein weiterer Anstieg auf 123 % detektiert. Für die Supplementierung von Uridin und Adenin werden diese als Stock-Lösungen hergestellt. Aufgrund des abweichenden Herstellungsdatums zwischen unmarkiertem und isotoopenmarkiertem Adenin kann durch Degradationsprozesse ein Konzentrationsunterschied entstehen. Während keine Stock-Lösungen verwendet wurden, die älter als 6 Monate waren, kann eine geringere Adenin-Konzentration im unmarkierten Spezial-Medium nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte den Unterschied der tRNA<sup>Phe</sup>-Abundanz zwischen den beiden Proben erklären. Der Anstieg von 116 % auf 123 % ist vergleichsweise geringen Ausmaßes und könnte ebenso auf allgemeine Ungenauigkeiten der Northern-Blot-Analytik zurückgeführt werden.

Wie zuvor postuliert kann bei der Supplementierung von isotoopenmarkiertem Uridin ein Absinken der tRNA<sup>Phe</sup>-Abundanz gegenüber den anderen Spezial-Medien detektiert werden (8 % und 15 %). Dies kann vermutlich auf die Verunreinigung des isotoopenmarkierten Uridins zurückgeführt werden. Dennoch ist ein leichter Anstieg der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz gegenüber dem Standard-Medium zu verzeichnen (8 %). Diese Feststellung weicht von den bisherigen Ergebnissen ab. Erneut kann dies auf unterschiedliches Alter der Stock-Lösungen oder an allgemeinen Ungenauigkeiten der Northern-Blot-Analytik zurückgeführt werden. In zukünftigen Experimenten sollte daher verstärkt auf Vergleichbarkeit der Stock-Lösungen geachtet werden. Eine Änderung in der Abundanz unter 10 % sollte zudem kritisch betrachtet werden. Während der postulierte Trend bestätigt werden konnte, bleibt unklar wie stark sich die Verwendung unterschiedlicher Medien auf die Abundanz verschiedener tRNA-Isoakzeptoren auswirkt. Eine gerichtete Anpassung der tRNA-Transkriptionsrate von 10–20 % kann nicht ausgeschlossen werden.

### 3.1.3 Einfluss von NAIL-MS auf tRNA-Isoakzeptoren (NAIL-MS)

Zur Überprüfung des Einflusses von NAIL-MS auf die tRNA-Isoakzeptor-Abundanz wurden Zellen über eine Dauer von 7 Tagen in unmarkiertem oder isotoopenmarkiertem Spezial-Medium (DMEM D0422) kultiviert. Gleiche Anteile unmarkierter und isotoopenmarkierter Zellen wurden unmittelbar vor der RNA-Extraktion vereinigt und prozessiert. Nach der Aufreinigung der tRNA-Isoakzeptoren können unmarkierte Nukleoside von isotoopenmarkierten über Massenspektrometrie unterschieden und so getrennt voneinander ausgewertet werden. Dieser Ansatz stellt sicher, dass keine Fehler aufgrund unterschiedlicher Effizienz bei der Aufreinigung entstehen. Nach Anreicherung der tRNA über SEC, wurden die einzelnen tRNA-Isoakzeptoren über Oligonukleotid(ON)-Hybridisierung isoliert. Aus denselben Proben wurde 5S rRNA zur Normalisierung aufgereinigt. Hierfür wurden RNA-Moleküle der Länge 100–500 Nukleotide über SEC angereichert, bevor die 5S rRNA aus dieser Fraktion ebenfalls über ON-Hybridisierung isoliert wurde. Aufgereinigte RNA wurde zu Nukleosiden verdaut und über Nukleosid-MS quantifiziert. Über **Gleichung 1** kann die Abundanz des jeweiligen tRNA-Isoakzeptors in isotoopenmarkiertem Medium (iso) gegenüber unmarkiertem (unm) berechnet werden.

$$(1) \quad Abundanz (\%) = \frac{Isoakzeptor_{iso} (pmol)}{5S\ rRNA_{iso} (pmol)} / \frac{Isoakzeptor_{unm} (pmol)}{5S\ rRNA_{unm} (pmol)}$$

Zusätzlich wurde getestet, ob eine Normalisierung über Gesamt-RNA möglich ist. Die Terme für 5S rRNA werden hierfür durch die Menge entsprechend markierter Gesamt-RNA ersetzt. Ein Vorteil bei der Verwendung von Gesamt-RNA wäre, dass weitaus größere Mengen zur Verfügung stehen. Durch die Normalisierung auf die Gesamtheit der RNA können allerdings Verzerrungen der Ergebnisse hervorgerufen werden, wobei nicht klar ist, ob diese eine verbesserte oder verschlechterte Abbildung der tatsächlichen Lage liefern. Ebenso ist unklar, wie sich die Isotoopenmarkierung auf die Abundanz der 5S rRNA auswirkt. Die Gesamt-RNA setzt sich zu ~ 80 % aus den rRNA-Untereinheiten zusammen, welche wie 5S rRNA auch, eine vergleichsweise geringe Reaktion auf die Anwendung von NAIL-MS zeigen sollten.

Wie aus **Tabelle 3.2** zu entnehmen, fällt der Unterschied an tRNA-Isoakzeptor-Abundanz zwischen unmarkierten und isotoopenmarkierten Zellen über NAIL-MS geringer aus als über Northern-Blot-Analytik. Wird über Gesamt-RNA normalisiert bewegen sich die Werte im Bereich 96–99 %. Dieser marginale Effekt könnte auf unvollständiger Isotoopenmarkierung mancher tRNA-Moleküle basieren und kann daher in den meisten Experimenten vernachlässigt werden. Wird über 5S rRNA normalisiert fallen die Unterschiede geringfügig höher aus und nähern sich den Northern-Blot-Ergebnissen an. Die Werte bewegen sich zwischen 92 % und

### 3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen

96 %. Beide Methoden lassen darauf schließen, dass abhängig von den verwendeten Isotopologen kaum Anpassungen der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz vorgenommen werden. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zwischen der Normalisierung über 5S rRNA und Gesamt-RNA wäre, dass sich in Gesamt-RNA ebenso ein geringer Anteil an tRNA befindet (~ 10 %). Die potenziell geringere Transkriptionsrate von tRNA ist in den Werten der Gesamt-RNA enthalten und eine Normalisierung über Gesamt-RNA lässt den Effekt auf die tRNA-Isoakzeptor-Abundanz daher geringer erscheinen.

Über Northern-Blot-Analytik war die Bestimmung des Effekts von NAIL-MS auf tRNA<sup>His</sup><sub>GUG</sub> erschwert, da die Bande lediglich ein minimales, kaum quantifizierbares Signal lieferte. Durch die hohe Abundanz von 5S rRNA in Gesamt-RNA war eine Auswertung aufgrund der stark unterschiedlichen Intensitäten kaum möglich. Während in der Northern-Blot-Analytik tRNA<sup>Phe</sup> als Referenz zu den publizierten Daten gezeigt wurde, konnte die Veränderung der tRNA<sup>His</sup>-Abundanz über NAIL-MS problemlos berechnet werden.

**Tabelle 3.2: Abundanz der tRNA-Isoakzeptoren in isotoopenmarkierten Zellen.** Die LC-MS/MS Signale der tRNA-Isoakzeptoren wurden entweder auf die Signale von aufgereinigter 5S rRNA oder von Gesamt-RNA referenziert. Die normalisierten Werte für isotoopenmarkierte Nukleoside wurde durch die normalisierten Werte unmarkierter Nukleoside dividiert, um den prozentualen Anteil an isotoopenmarkierten tRNA-Isoakzeptoren gegenüber unmarkierten zu bestimmen. Zum Vergleich sind zusätzlich die Werte der vorangegangenen Northern-Blot-Analytik eingetragen.

	His	Tyr	Asn	Asp	Ser	Gly
<b>über 5S rRNA</b>	94 %	94 %	96 %	92 %	96 %	95 %
<b>über Gesamt-RNA</b>	97 %	97 %	99 %	96 %	98 %	97 %
<b>über Northern Blot</b>	n.a.	92 %	85 %	94 %	85 %	92 %

Während nicht gänzlich klar ist woher die Abweichungen zwischen Northern-Blot- und NAIL-MS-Analytik kommen, wird abermals die Stärke von NAIL-MS aufgezeigt. Mithilfe der verwendeten Isotoopenmarkierung kann die Veränderung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz anhand von LC-MS/MS bestimmt werden. Ohne geeignete Isotoopenmarkierung wäre dies erschwert, da die Möglichkeit einer Normalisierung nur über die Injektionsmenge zu bewerkstelligen ist. Hier können kleine Abweichungen entstehen, welche letztendlich zu großen Verfälschungen der Ergebnisse führen. Die Ursache der geringfügigen Diskrepanz zwischen den Northern-Blot-Ergebnissen und der Bestimmung über NAIL-MS sollte eingehender untersucht werden, um mögliche Fehlerquellen in zukünftigen Stressexperimenten zu eliminieren.



NAIL-MS bietet die Möglichkeit vergleichende Studien, ohne den Einfluss von Prozessierungsschritten durchzuführen. Analog zu SILAC (kurz für engl. stable isotope labeling by amino acids in cell culture) werden zwei Kulturen in verschiedenen isopenmarkierten Medien kultiviert. Eine Kultur dient der Kontrolle, während die zweite Kultur Gegenstand des Forschungsinteresses wird. So kann beispielsweise eine Kontroll-Kultur in unmarkiertem Medium kultiviert werden, während eine Knockout-Kultur in isopenmarkiertem Medium kultiviert wird. Beide können vor der RNA-Isolation und -Aufreinigung vereinigt werden. Bei der Analyse über Nukleosid-MS können beide Kulturen aufgrund des Masseunterschieds der Nukleoside unterschieden und getrennt voneinander ausgewertet werden.

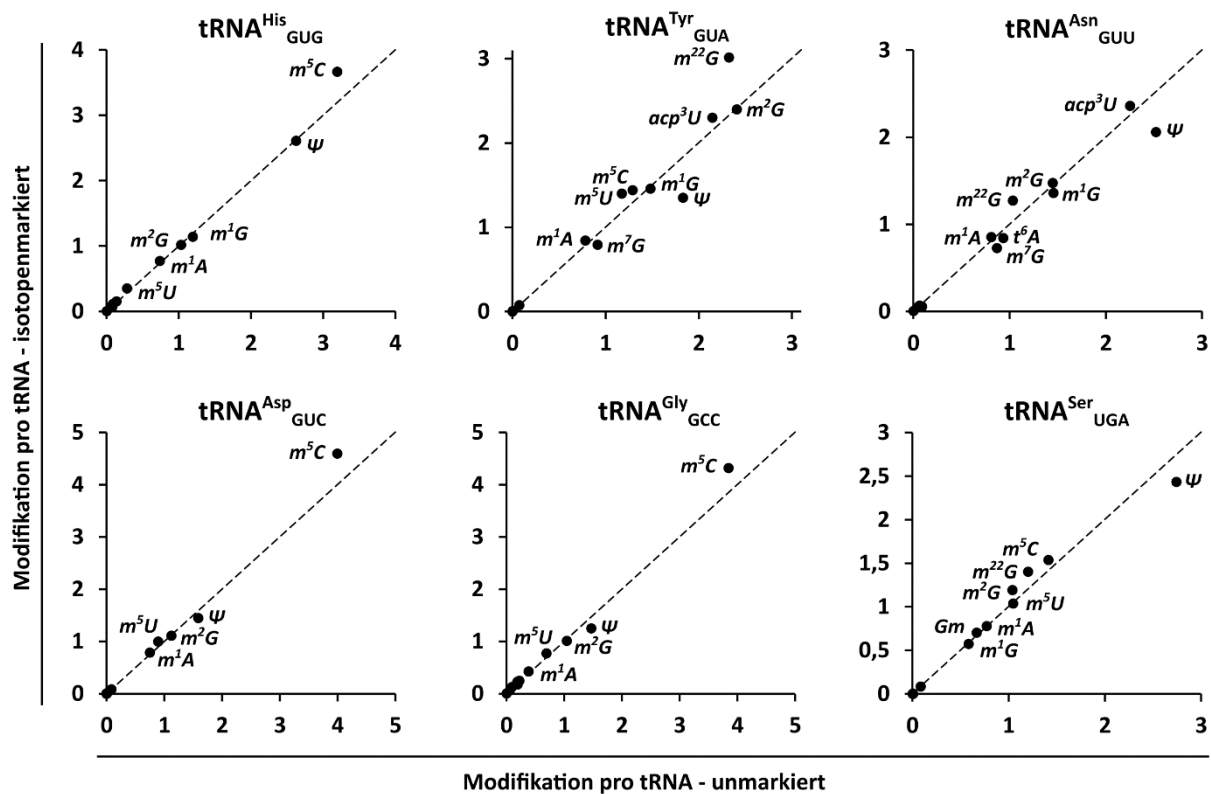
Die durch die Isopenmarkierung entstehende Abweichung im Modifikationsprofil sollte zuvor bestimmt werden. Für jede Modifikation entsteht so ein Schwellenwert, der überschritten werden sollte, um einen klaren Effekt identifizieren zu können. Diese Validierung wurde, parallel zur Bestimmung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz, aus denselben NAIL-MS Daten entnommen. Für jeden tRNA-Isoakzeptor wurde die Modifikationsmenge pro tRNA-Molekül bestimmt. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Werte für unmarkierte und isopenmarkierte Modifikationen gegeneinander aufgetragen. Ausgewiesen werden lediglich Modifikationen mit einer Abundanz  $> 0,2$  pro tRNA-Molekül. Zusätzlich wurde eine Diagonale in die Diagramme eingetragen. Datenpunkte, welche sich auf dieser befinden repräsentieren Modifikationen, deren Abundanz sich im jeweiligen tRNA-Isoakzeptor, abhängig von der Isopenmarkierung, nicht ändert (**Abbildung 3.7**). Absolute Messwerte können **Tabelle S2** entnommen werden.

Die meisten Modifikationen zeigen kaum eine Abhängigkeit zwischen der Modifikationsmenge und der Isopenmarkierung. Allgemein scheint  $m^5C$  in den meisten tRNA-Isoakzeptoren der isopenmarkierten Zellen leicht angehoben zu sein, während  $\Psi$  einen gegenteiligen Trend aufweist. Für  $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{His}$  und  $tRNA^{Gly}$  sind lediglich minimale Veränderungen im Modifikationsprofil zu erkennen. Hier kann NAIL-MS problemlos angewandt werden, um Modifikationsdynamiken *in vivo* zu untersuchen. In den tRNA-Isoakzeptoren  $tRNA^{Tyr}$ ,  $tRNA^{Asn}$  und  $tRNA^{Ser}$  weichen einige Modifikationen leicht von der Diagonalen ab. Besonders anfällig für diesen Effekt scheint  $tRNA^{Tyr}$  zu sein. Insbesondere  $m^{22}G$  zeigt gegenüber den unmarkierten Zellen ein vermehrtes Auftreten in isopenmarkiertem Medium. Dieser Effekt ist auch in  $tRNA^{Asn}$  und  $tRNA^{Ser}$  zu erkennen. Erneut soll hier erwähnt werden, dass das supplementierte isopenmarkierte Uridin Verunreinigungen enthält. Diese können eine Anpassung des Modifikationsprofils hervorrufen, wie sie für manche tRNA-Isoakzeptoren zu erkennen ist. Eine

### 3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen

mögliche Schlussfolgerung wäre beispielsweise die Relevanz von tRNA<sup>Tyr</sup> und des entsprechenden Modifikationsprofils als Antwort der Zellen auf diese Verunreinigung.

Zusätzlich wurde die Abundanz der Modifikationen in Gesamt-RNA und tRNA bestimmt (**Abbildung S2**). Verglichen mit den einzelnen tRNA-Isoakzeptoren sind kaum Änderungen im Modifikationsprofil zu erkennen. Lediglich m<sup>5</sup>C und Ψ zeigen dieselben Effekte wie sie schon für einzelne tRNA-Isoakzeptoren zu beobachten waren. Dies lässt darauf schließen, dass eine allgemeine Reaktion der Zelle auf die Isotopenmarkierung entsteht. Allerdings könnte für diese beiden Modifikationen ebenso ein systematischer Fehler in der Analytik über NAIL-MS vorliegen, welcher bisher nicht näher bestimmt werden konnte. Erhöhte Mengen an acp<sup>3</sup>U könnten durch falsche Einwaagen des Kalibrier-Standards oder durch Degradationsprozesse ebendieses erklärt werden. Dieser scheint Verunreinigungen zu enthalten, welche letztendlich zu einer zu hohen Einschätzung der Konzentration von acp<sup>3</sup>U führen.



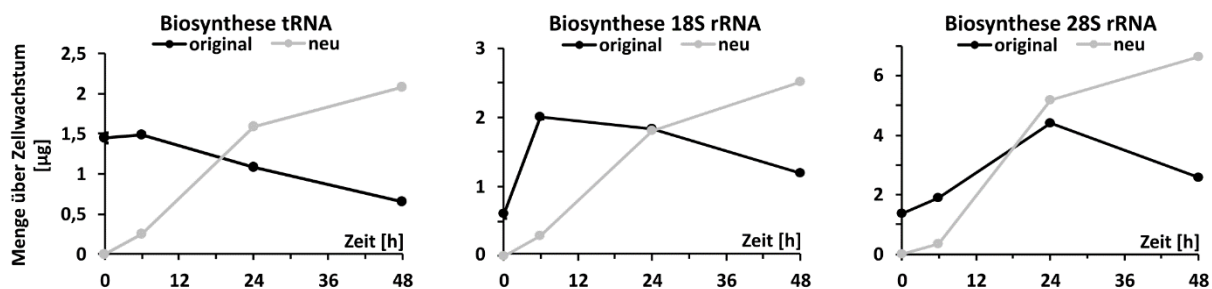
**Abbildung 3.7: Auswirkung von NAIL-MS auf das Modifikationsprofil von tRNA-Isoakzeptoren.** Zellen wurden in unmarkiertem und isotoopenmarkiertem Medium kultiviert und während der RNA-Extraktion vereinigt. tRNA-Isoakzeptoren wurden aufgereinigt und auf das Modifikationsprofil untersucht. Auf der x-Achse ist jeweils die gemessene Anzahl an ausgewiesener Modifikation in unmarkierten Zellen aufgetragen. Auf der y-Achse ist die entsprechende Menge isotoopenmarkierter Modifikation aufgetragen. Die gestrichelte Linie stellt eine Diagonale dar. Modifikationen, welche sich auf dieser befinden, zeigen keine Änderung der Abundanz abhängig vom gewählten Medium.

Der Vergleich des Modifikationsprofils zwischen unmarkierten und isotoopenmarkierten RNA-Molekülen dient hier lediglich der Validierung der NAIL-MS Methodik. Es bleibt anzumerken, dass für entsprechende NAIL-MS Experimente stets die Auswirkung der Isotoopenmarkierung auf die Abundanz und das Modifikationsprofil der zu untersuchenden RNA festgestellt werden sollte. Nur so kann sichergestellt werden, dass etwaige Effekte im finalen Experiment korrekt interpretiert werden. In **Kapitel 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle** wird anhand von vergleichenden NAIL-MS Experimenten untersucht wie sich die Zugabe von Queuin in Zellkultur auf die tRNA-Abundanz und die Modifikationsmenge auswirkt.

### 3.1.4 Kinetik des Auf- und Abbaus von RNA-Molekülen

Die erhobenen Daten aus Heiss *et al.* (*Nat. Comm.*, **2021**) können des Weiteren zur Untersuchung des Auf- und Abbaus der jeweiligen RNA-Moleküle verwendet werden. Originale Moleküle sind bereits vor einem Mediumwechsel von unmarkiert zu isotoopenmarkiert vorhanden, wohingegen neue Moleküle erst nach Wechsel des Mediums von den Zellen synthetisiert werden. Die absoluten Mengen wurden gemäß **Gleichung 2**, durch Multiplikation des Quotienten aus originalen und neuen Molekülen (ermittelt über QQQ) mit der aufgereinigten Menge an jeweiligem Molekül (ermittelt über Nanophotometrie), für jeden Zeitpunkt  $t$  ermittelt. Dieser Berechnungsschritt stellt sicher, dass die absoluten Mengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untereinander vergleichbar sind.

$$(2) \quad m_t(\mu g) = \frac{unl_t(\text{pmol})}{lab_t(\text{pmol})} \cdot c_t\left(\frac{\mu g}{\mu L}\right) \cdot v_t(\mu L)$$



**Abbildung 3.8: Zeitlicher Verlauf des Auf- und Abbaus von RNA-Molekülen.** Anhand der aufgereinigten Menge des jeweiligen RNA-Moleküls (tRNA, 18S rRNA oder 28S rRNA) und dem Verhältnis von originalen zu neuen Molekülen, ermittelt über QQQ-Messung, wurden die absoluten Mengen originaler und neuer RNA-Moleküle berechnet und über die Zeit geplottet.

Betrachtet man den Abbau originaler tRNA-Moleküle lässt sich beobachten, dass nach etwa 48 h eine Halbierung ebendieser stattgefunden hat (**Abbildung 3.8**). Wird durch den Startwert von 1,445 pmol bei Zeitpunkt 0 und den Endwert von 0,646 pmol bei Zeitpunkt 48 eine Gerade gelegt, wird **Gleichung 3** erhalten. Durch Umstellen und Lösen ebendieser für 50 % der Startmenge an originaler tRNA ergibt sich eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} \approx 43$  h. Dies entspricht der Zeit, in der die Hälfte der originalen tRNA-Moleküle abgebaut wurde. Dieser Wert deckt sich mit der Literaturangabe für vergleichbare Zellen<sup>276, 279</sup> und zeigt abermals die Stärke von NAIL-MS auf.

$$(3) \quad y = -0,017x + 1,445$$

Die entsprechende Berechnung der Halbwertszeit für 18S und 28S rRNA ist für diesen Experimentaufbau nicht möglich. Betrachtet man den Abbau originaler 18S und 28S rRNA-Moleküle fällt auf, dass der Anteil an originalen, also unmarkierten Molekülen, direkt nach Wechsel auf isotonenmarkiertes Medium zu Anfang noch deutlich ansteigt. Obwohl zuvor gezeigt wurde, dass sowohl die *de novo* Biosynthese von Nukleotiden als auch die Wiederverwendung bereits in RNA eingebauter Nukleoside keine, oder eine nur untergeordnete Rolle in 18S rRNA spielt, wirkt es in diesem Datenset so, als würden originale Nukleoside für die Biosynthese neuer RNA-Moleküle verwendet werden. Auffällig ist, dass dieser Effekt lediglich für ribosomale RNA, nicht aber für tRNA eintritt. Im Vergleich zu tRNA sind beide ribosomalen Untereinheiten um einiges länger, wodurch die Prozessierung, welche unter anderem Spleißen und Modifizierung beinhaltet, deutlich komplexer ist und mehr Zeit in Anspruch nimmt. Während ein tRNA-Molekül im Schnitt etwa 75 Nukleotide lang ist, sind es bei der 18S rRNA Untereinheit fast 1800 und bei der 28S rRNA-Untereinheit nahezu 5000 Nukleotide. Zudem werden die 18S, die 28S und die 5,8S rRNA-Untereinheiten durch eine einzelne Gensequenz codiert. Dies hat zur Folge, dass das transkribierte RNA-Molekül zuerst zu den einzelnen Untereinheiten prozessiert werden muss.<sup>280</sup> Obwohl die initiale Prozessierung der rRNA-Untereinheiten nur wenige Minuten dauert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die entstandenen RNA-Moleküle aufgrund anderer Effekte (bspw. Bindung zu DNA oder Proteinen) erst später detektiert werden können.

Eine Erklärung für das hier auftretende Phänomen wäre, dass von den Zellen bereits vor Mediumwechsel eine erhebliche Menge an nicht fertig prozessierter rRNA synthetisiert wurde. Durch die unvollständige Prozessierung werden diese bei der Isolation von 18S und 28S rRNA mit dem aktuellen Design der Extraktions- und Aufreinigungsmethoden aufgrund eines bisher nicht näher bestimmten Grundes jedoch nicht aufgereinigt und fehlen daher in der Analytik. Unmarkierten Nukleoside dieser rRNA-Moleküle werden dann erst nach vollständiger Prozessierung detektiert. Dies könnte erklären, warum nach 6 h ein Anstieg an originaler 18S rRNA und sogar noch nach 24 h für 28S rRNA zu verzeichnen ist. Für die Prozessierung der größeren 28S rRNA wird mehr Zeit in Anspruch genommen als für die kleinere 18S rRNA Untereinheit. Erst nach diesen Zeitpunkten fällt die Menge an unmarkierten Molekülen wieder ab. Bei engerer Wahl der Zeitpunkte könnte die Halbwertszeit der 18S und 28S rRNA vermutlich dennoch bestimmt werden. Hierfür müsste durch das Maximum an originaler RNA und den Endpunkt die entsprechende Gerade gelegt und die Steigung daraus berechnet werden.

Bei der Betrachtung von neu synthetisierten RNA-Molekülen fällt auf, dass nach 24 h der Anteil an neuer RNA (isotonenmarkiert) den der originalen RNA (unmarkiert) übersteigt. Dies ist

### 3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen

sowohl für tRNA als auch für die ribosomalen Untereinheiten der Fall. Da die Verdopplungsrate der verwendeten HEK-293-Kultur auf ~ 20 h bestimmt wurde, ist dies auf die nun höhere Anzahl an Zellen, welche nach Mediumwechsel entstanden sind, zurückzuführen. Alle neu entstehenden Zellen bedienen sich der zugefütterten, isopenmarkierten Varianten von Adenin und Uridin für die Biosynthese neuer RNA-Moleküle.

Ein Faktor, der in den vorangegangenen Berechnungen nicht berücksichtigt wurde, ist der Verlust von RNA während der Isolation und Aufreinigung der jeweiligen RNA-Moleküle. Sowohl die Ausbeute für Gesamt-RNA als auch die für aufgereinigte tRNA, 18S rRNA und 28S rRNA lagen im erwarteten Bereich. Zudem weisen alle drei RNA-Moleküle einen unterschiedlichen Trend auf, was gegen die Ursache eines Materialverlustes bei der initialen Aufreinigung der Gesamt-RNA für die gezeigten Ergebnisse spricht. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse durch Verluste bei einzelnen Proben während der weiteren Aufreinigung der RNA-Moleküle verfälscht wurden. Diesem Fehler könnte durch die Zugabe eines Standards vor der RNA-Aufreinigung entgegengewirkt werden. Eine Voraussetzung dieses Standards ist, dass er vom Rest der aufgereinigten RNA unterschieden werden kann. Dies kann beispielsweise durch ein *in vitro* synthetisiertes RNA-Molekül mit definierter Isopenmarkierung – welche sich von der im Experiment verwendeten Isopenstrategie unterscheidet – bewerkstelligt werden. Durch äquivalente Zugabe des Standards vor der RNA-Aufreinigung kann die Ausbeute nach der Fällung in allen Proben anhand der Menge an wiedergewonnenem Standard berechnet werden.

Allgemein kann, wie zuvor bereits besprochen, davon ausgegangen werden, dass Zellen auf die zugefütterten Isopen-Varianten von Adenin und Uridin zurückgreifen, sobald diese dem Medium zugegeben werden. Halbwertszeiten von RNA-Molekülen in der Zelle können bestimmt werden, sofern die Biosynthese und Prozessierung aller ursprünglichen RNA-Moleküle vollendet ist. Der Anstieg von Nukleosiden nach Mediumwechsel, welche die Isopenmarkierung des ursprünglichen Mediums tragen, kann durch die noch nicht vollendete Prozessierung der jeweiligen RNA-Moleküle erklärt werden. Diese fehlen aufgrund des Designs der RNA-Extraktions- und -Aufreinigungsmethoden in der Analytik und erscheinen dort erst nach vollständiger Prozessierung. Dieser Effekt ist unter anderem abhängig von der Länge der jeweiligen RNA-Moleküle und sollte daher, insbesondere für Untersuchungen an mRNA, für das jeweilige Molekül bestimmt werden. Dies beugt der falschen Interpretation von Daten aufgrund des gezeigten Phänomens vor.

### 3.1.5 Prozessierung der 28S rRNA Untereinheit

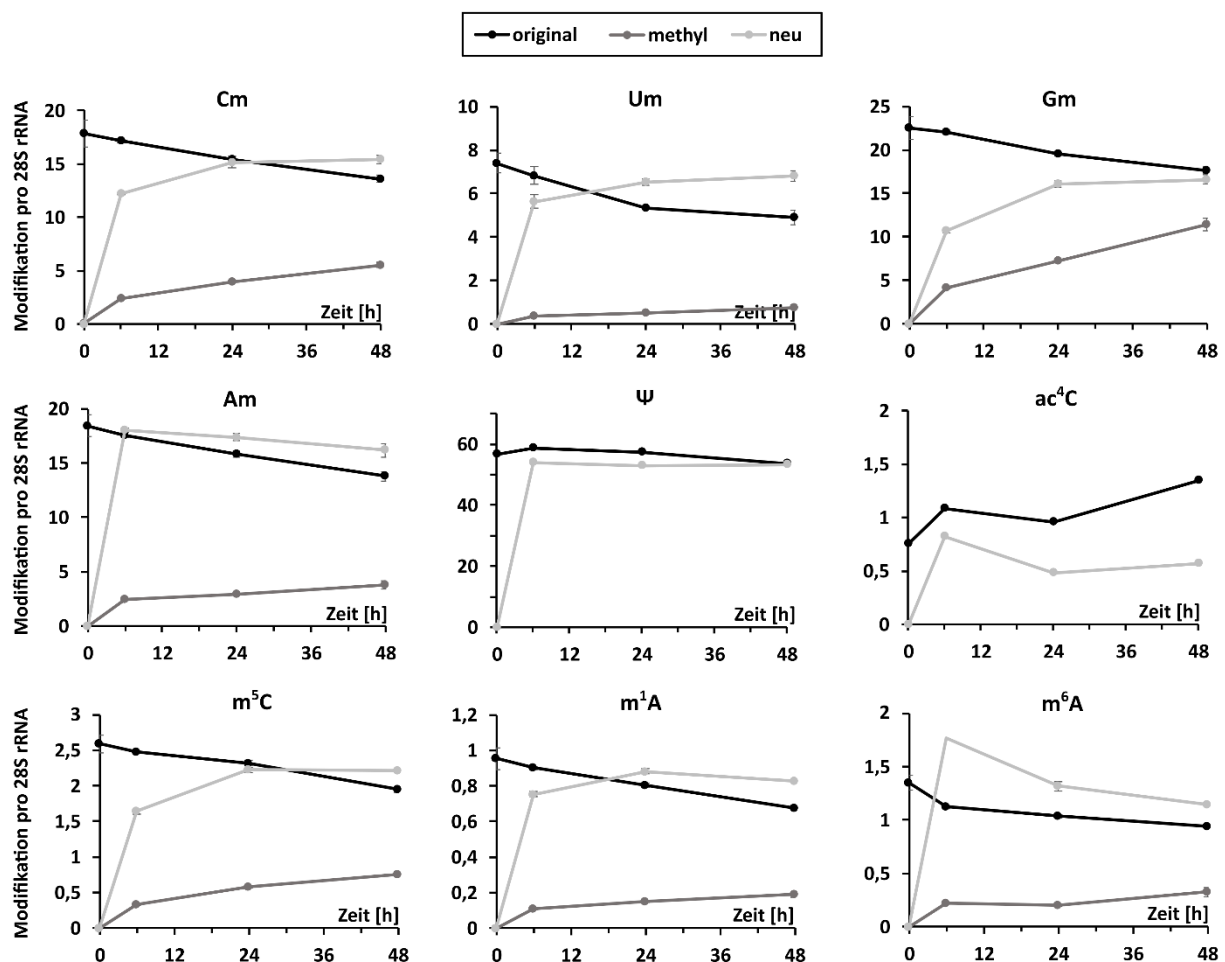
In Heiss *et al.* (*Nat. Comm.*, **2021**) wurde sowohl auf die Prozessierung von tRNA und im speziellen tRNA<sup>Phe</sup>, als auch auf die Prozessierung der 18S rRNA Untereinheit eingegangen. Aus denselben Proben wurde 28S rRNA aufgereinigt und über Nukleosid-MS analysiert. Originale Modifikationen (original) sind bereits vor Mediumwechsel vollständig maturiert und wurden auf originale kanonische Nukleoside referenziert. Kanonische Nukleoside, welche nach Experimentstart methyliert wurden (methyl) sind ebenfalls auf originale kanonische Nukleoside referenziert, wohingegen neue Modifikationen (neu), auf neue kanonische Nukleoside referenziert wurden. Absolute Mengen der gefundenen RNA-Modifikationen werden in **Kapitel 3.5.3 Allgemeine Modifikations-Studien** zusammengefasst.

Die Daten offenbaren eine hohe Vergleichbarkeit des Abbaus von Modifikationen in 28S rRNA. Abgesehen von  $\Psi$  und  $ac^4C$  ist nach 48 h für alle Modifikationen eine Abnahme von etwa 20 % der jeweiligen Ausgangsmenge zu erkennen (**Abbildung 3.9**). Eine parallele, zu gleichen Anteilen auftretende aktive Demodifizierung aller in 28S rRNA auftretenden Modifikationen erscheint unwahrscheinlich. Das Absinken des Modifikationslevels ist demnach entweder auf Degradation der 28S rRNA oder auf die Verdünnung ebendieser durch neu entstehende 28S rRNA zurückzuführen. Im Normalfall wird der Effekt der Verdünnung durch die Anwendung von NAIL-MS messbar und kann somit vernachlässigt werden. Wie allerdings bereits zuvor in **Kapitel 3.1.4 Kinetik des Auf- und Abbaus von RNA-Molekülen** gezeigt wurde, kann ein Einfluss dieses Effekts bei ribosomaler RNA nicht ausgeschlossen werden. Selbst nach Mediumwechsel konnte noch ein Anstieg originaler Nukleoside verzeichnet werden. Durch die anschließende Prozessierung erscheint es möglich, dass die originalen, unmarkierten RNA-Moleküle ihre Methylgruppen von isopenmarkiertem Methionin im neuen Medium erhalten und daher – trotz Modifizierung noch während des initialen Reifungsprozesses – unter die Kategorie der nachträglich modifizierten Moleküle fallen. Wird der Abbau originaler Modifikationen mit dem Anstieg nachträglich modifizierter Moleküle verglichen, lässt sich eine umgekehrte Korrelation erkennen. Die Summe aus originalen und nachträglich methylierten Modifikationen weist dabei für die meisten Modifikationen über den kompletten Experimentverlauf ein konstantes Level auf. Dies spricht sowohl gegen einen präferierten Abbau von modifizierten rRNA-Molekülen als auch gegen die aktive Demodifizierung dieser. Der Rückgang der Modifikationsmenge in originaler 28S rRNA ist demnach höchstwahrscheinlich auf Verdünnung durch neu entstehende 28S rRNA-Moleküle zurückzuführen.



### 3.1 Etablierung und Anwendung von NAIL-MS in Zellkulturen

Für die meisten Modifikationen ist in neuen Transkripten nach 6 h bereits ein Modifikationslevel von  $> 80\%$  zu verzeichnen. Einige Modifikationen weisen jedoch einen besonders schnellen Einbau in neue 28S rRNA-Moleküle auf. Während Am und  $m^6A$  nach 6 h bereits zu  $100\%$  modifiziert sind, werden auch Um und  $m^1A$  recht schnell inkorporiert. Dies spricht für eine frühe Modifizierung der entstehenden 28S rRNA-Moleküle mit diesen Modifikationen. Interessanterweise weisen die gleichen Modifikationen ein vergleichsweise geringes Level an nachträglicher Modifizierung auf. Dies war zu erwarten, da durch die frühe Modifizierung der jeweiligen Position der nachträgliche Einbau der entsprechenden Modifikation nicht mehr nötig ist. Besonders auffällig ist die geringe Menge an nachträglicher Modifizierung für Um, aber auch Am,  $m^1A$  und  $m^6A$  weisen ein eher geringes Level auf. Dies deckt sich mit den Modifikationen, welche einen raschen Einbau in neue 28S rRNA-Moleküle aufweisen.



**Abbildung 3.9: Dynamik ausgewählter modifizierter Nukleoside in 28S rRNA.** Gezeigt sind alle Modifikationen mit einer Abundanz  $> 0,9$  Modifikation pro 28S rRNA. Ursprüngliche Nukleoside (original, schwarze Linie) existierten bereits vor Mediumwechsel. Nachträglich methylierte Nukleoside (methyl, dunkelgraue Linie) sind Modifikationen, die durch nachträgliche Methylierung der ursprünglichen RNA nach Mediumwechsel entstanden sind. Neue Nukleoside (neu, hellgraue Linie) zeigen den Einbau der Modifikation in neue Transkripte. Die Datenpunkte geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von  $n = 3$  biologischen Replikaten wieder.

Die Menge an  $m^6A$  in neuer 28S rRNA steigt anfänglich auf über 100 % der zu erwartenden Menge (Menge originaler Modifikation bei  $t = 0$ ). Zudem ist hier ein besonders ausgeprägter Rückgang der Modifikationsmenge in originaler 28S rRNA zu Beginn des Experiments zu verzeichnen. Dieser Effekt ist ausschließlich für  $m^6A$  zu beobachten, daher kann davon ausgegangen werden, dass eine aktive Demodifizierung von  $m^6A$  stattfindet, oder Moleküle, welche die  $m^6A$ -Modifikation tragen bevorzugt degradiert werden. Es erscheint möglich, dass sich eine  $m^6A$ -Position in der 28S rRNA befindet, welche anschließend entfernt wird. Beispielsweise könnte sich diese in einem herauszuschneidenden Teil der nicht fertig prozessierten 28S rRNA befinden und durch das anschließende Spleißen dieses Introns den verstärkten Rückgang der  $m^6A$ -Menge erklären. Dies steht jedoch im Konflikt mit der Hypothese, dass nicht fertig prozessierten 28S rRNA-Moleküle durch die verwendeten Aufreinigungsmethoden aus der Analytik ausgeschlossen werden. Außerdem könnte  $m^6A$  für den Export der 28S rRNA aus dem Nukleus erforderlich sein, wie es schon für mRNA beobachtet wurde.<sup>281, 282</sup> Eine anschließende aktive Demodifizierung im Zytoplasma würde den beobachteten Effekt ebenfalls erklären. Ein wahrscheinlicheres Szenario ist allerdings, dass sich ein gewisser Anteil von mRNA in der aufgereinigten 28S rRNA-Fraktion befindet und über den eben beschriebenen Mechanismus zu dem beobachteten Effekt führt. Im Vergleich zu rRNA-Molekülen weisen mRNA-Moleküle eine geringe Halbwertszeit auf, weshalb der Effekt zu Beginn des Experiments besonders stark ausgeprägt ist.

Eine besondere Rolle in diesem Experiment nimmt die Modifikationen  $\Psi$  ein: Das Level von  $\Psi$  ist über lange Zeit konstant und selbst nach 48 h sind noch 95 % der ursprünglichen  $\Psi$ -Modifikationen zu detektieren. Die Relevanz von  $\Psi$  im 28S rRNA-Molekül bestätigt sich auch durch den raschen Einbau in neue Transkripte. Bereits nach 6 h wurde die volle, zu erwartende Menge quantifiziert. Auch diese bleibt über den weiteren Experimentverlauf konstant. Anders als für die meisten Modifikationen ist hier keine Verdünnung der originalen Modifikationen durch neu entstehende rRNA-Moleküle zu erkennen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass  $\Psi$ , aufgrund der nicht vorhandenen Methylgruppe, unabhängig von der Isotopenmarkierung des zugefütterten Methionins eingebaut wird. Durch die Isomerisierung von Uridin erhält  $\Psi$  stets dasselbe Isotopenmuster wie die respektiven kanonischen Nukleoside der jeweiligen rRNA-Moleküle.<sup>46, 283</sup> Eine Verdünnung der originalen  $\Psi$ -Modifikationen durch nachträglich modifizierte rRNA-Moleküle findet daher nicht statt. Ein ähnlicher Effekt wäre für  $ac^4C$  zu erwarten. Im Vergleich zu anderen Modifikationen schwankt die Menge von  $ac^4C$  über die Zeit

jedoch stark und eine Interpretation ist daher nur schwer möglich. Der Anstieg originaler Modifikationen nach Mediumwechsel deutet jedoch auf eine deutlich ausgeprägte nachträgliche Modifizierung hin, welche in weiteren Experimenten genauer untersucht werden sollte.

Es kann geschlussfolgert werden, dass die 28S rRNA-Untereinheit während oder, abhängig von der Modifikation, direkt nach der Transkription mit den jeweiligen Modifikationen ausgestattet wird. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit der Tatsache, dass die meisten Regionen der ribosomalen Untereinheiten nach der Biosynthese, Prozessierung und Faltung für modifizierende Enzyme nur schwer zugänglich im Inneren des Ribosoms vorliegen.<sup>277</sup> Dies erfordert eine direkte Modifizierung der entsprechenden Nukleoside noch während der Transkription, wie sie in der Literatur bereits berichtet wurde.<sup>284</sup> Angesichts der Tatsache, dass sich das Gleichgewicht für einige Modifikationen erst nach mehreren Stunden einstellt, kann davon ausgegangen werden, dass ebendiese Modifikationen zusätzlich eine nachträgliche Modifizierung bestimmter Positionen zeigen, wie sie ebenfalls bereits berichtet wurde.<sup>285, 286</sup> Die nachträgliche Modifizierung bereits existierender RNA-Moleküle, wie sie in diesem Experiment zu erkennen ist, könnte jedoch überbewertet sein: Einige Modifikationen werden anscheinend durch die Verwendung von D<sub>3</sub>-Methionin für die Methylierung originaler (unmarkierter) kanonischer Nukleoside als nachträglich modifiziert eingestuft, obwohl von einer Modifizierung noch während der Prozessierung ausgegangen werden kann.

Die Dynamik weiterer detektierter, jedoch weniger abundanter Modifikationen (m<sup>66</sup>A, m<sup>7</sup>G, m<sup>3</sup>U) kann **Abbildung S3** entnommen werden.

## 3.2 NMR-Untersuchungen zur tRNA Prozessierung in Hefe

### Prolog

Neben Massenspektrometrie ist Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR – nuclear magnetic resonance) eine grundlegende Methode zur Untersuchung der Struktur von Molekülen. Beide Herangehensweisen sind allerdings nur bedingt geeignet, wenn dynamische Prozesse innerhalb eines Organismus untersucht werden sollen. Für massenspektrometrische Analysen wurde dieses Problem teilweise durch die zuvor beschriebene Isotopenmarkierung durch NAIL-MS behoben. Aber auch NMR-Analytik kann zur Aufklärung von Reifungsprozessen biologischer Moleküle herangezogen werden. Hierfür wurde unmodifizierte,  $^{15}\text{N}$ -markierte tRNA<sup>Phe</sup> *in vitro* hergestellt und anschließend mit Zellextrakten aus Hefe inkubiert. Bei der Gewinnung des Zellextrakts wurde auf die bestehende Funktionalität der enthaltenen Enzyme geachtet. Die Inkubation erfolgte im NMR-Probenröhrchen selbst und ermöglichte somit die zeitaufgelöste, fortlaufende Aufzeichnung von Spektren. Somit konnte nicht nur die Kinetik des Einbaus einzelner Modifikationen untersucht werden, sondern auch näher auf die Hierarchie des Einbaus eingegangen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Modifikationen in einer definierten sequenziellen Reihenfolge eingeführt werden. Unter anderem konnte eine starke Abhängigkeit der Inkorporation von m<sup>5</sup>U54 von Ψ55 festgestellt werden, welche beide wiederum den Einbau von m<sup>1</sup>A58 begünstigen. Des Weiteren konnte durch die Inkubation mit Zellextrakten aus Knock-out-Varianten (KO) für diverse Enzyme die Abhängigkeit der einzelnen Modifikationen untereinander bestätigt werden. Massenspektrometrische Untersuchungen dieser KO-Zelllinien unterstützen dabei die gefundenen Effekte und Abhängigkeiten und zeigen, dass die in Hefeextrakt mit NMR identifizierten Modifikationskreisläufe auch den tRNA-Modifikationsprozess in lebenden Zellen beeinflussen.

„Time-resolved NMR monitoring of tRNA maturation“, P. Barraud, A. Gato, **M. Heiss**, M. Catala, S. Kellner, C. Tisé; *Nature communications*, **2019**, 10 (1): 3373.

Autorenbeitrag: Die Etablierung und Durchführung zeitaufgelöster NMR-Experimente fand im Labor von C. Tisé statt. Die Aufreinigung und massenspektrometrische Datenerhebung und Analyse der tRNA aus den entsprechenden Hefekulturen wurde von mir durchgeführt.

Kopie des Artikels mit Erlaubnis des Verlages: <https://www.nature.com/ncomms/>



## ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11356-w>

OPEN

# Time-resolved NMR monitoring of tRNA maturation

Pierre Barraud <sup>1</sup>, Alexandre Gato<sup>1</sup>, Matthias Heiss<sup>2</sup>, Marjorie Catala<sup>1</sup>, Stefanie Kellner <sup>2</sup> & Carine Tisné <sup>1</sup>

Although the biological importance of post-transcriptional RNA modifications in gene expression is widely appreciated, methods to directly detect their introduction during RNA biosynthesis are rare and do not easily provide information on the temporal nature of events. Here, we introduce the application of NMR spectroscopy to observe the maturation of tRNAs in cell extracts. By following the maturation of yeast tRNA<sup>Phe</sup> with time-resolved NMR measurements, we show that modifications are introduced in a defined sequential order, and that the chronology is controlled by cross-talk between modification events. In particular, we show that a strong hierarchy controls the introduction of the T54, Ψ55 and m<sup>1</sup>A58 modifications in the T-arm, and we demonstrate that the modification circuits identified in yeast extract with NMR also impact the tRNA modification process in living cells. The NMR-based methodology presented here could be adapted to investigate different aspects of tRNA maturation and RNA modifications in general.

<sup>1</sup> Expression génétique microbienne, UMR 8261, CNRS, Université de Paris, Institut de biologie physico-chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France. <sup>2</sup> Department of Chemistry, Ludwig Maximilians University Munich, Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.B. (email: [pierre.barraud@cnrs.fr](mailto:pierre.barraud@cnrs.fr)) or to C.T. (email: [carine.tisne@cnrs.fr](mailto:carine.tisne@cnrs.fr))

Over 170 nucleotide modifications are currently reported in RNAs from the three domains of life, the vast majority being found in tRNAs<sup>1,2</sup>. This family not only displays the largest variety of post-transcriptional decorations among RNA molecules, but also the highest density of modifications per RNA transcript<sup>3,4</sup>. The introduction of post-transcriptional chemical modifications is central in the maturation process to generate functional tRNA molecules<sup>5–7</sup>. The biogenesis of tRNAs is a multi-step process that comprises the synthesis of a tRNA precursor (pre-tRNA) by transcription of a tRNA gene, the removal of the 5'-leader and 3'-trailer sequences, the addition of the 3'-CCA amino-acid accepting sequence, the removal of intronic sequences when present, and the incorporation of a large number of post-transcriptional chemical modifications<sup>8</sup>. Modifications are found in two main regions of the L-shaped structure of tRNAs, the tRNA core, and the anticodon-loop region (ACL)<sup>4</sup>. All cellular functions of tRNAs, including their alternative functions outside translation, are controlled and modulated by modifications<sup>9,10</sup>. While modified nucleotides in the ACL participate in decoding during protein synthesis<sup>11,12</sup>, those in the tRNA core are collectively implicated in the folding and stability of tRNAs<sup>13</sup>.

While a simple model would be that modifications are introduced to tRNA independently, several modification circuits have been identified in which one or more modifications stimulate formation of a subsequent modification<sup>7,14</sup>. This obviously drives a defined sequential order in the tRNA modification process. In addition, the interdependence of multiple modification events might in certain cases be responsible for the variations of tRNA modifications in response to environmental perturbations<sup>2,7,15–17</sup>. The characterization of modification circuits is therefore central to understand the dynamic regulation of modifications in tRNAs, however their identification remains difficult, since monitoring tRNA maturation at a single nucleotide level in a time-resolved fashion is technically challenging<sup>18</sup>.

In the past 10 years, NMR spectroscopy became a pre-eminent method to investigate post-translational modifications (PTMs) in proteins<sup>19,20</sup>. Time-resolved NMR measurements provided the means to monitor the establishment of PTMs in vitro, in cellular extracts and in living cells<sup>21–25</sup>. In addition, monitoring the introduction of PTMs with NMR has provided mechanistic insights into modification hierarchies, with initial modifications exhibiting stimulatory or inhibitory effects on subsequent modification events<sup>26,27</sup>.

Here, inspired by the NMR monitoring of PTMs in cellular environments, we report an original methodology to monitor RNA modifications in cellular extracts with NMR. Using yeast tRNA<sup>Phe</sup> as a model system, we demonstrate that multiple modification events can be monitored in yeast extract with NMR in a time-resolved fashion. Using continuous NMR measurements to measure a series of snapshots of the tRNA along the maturation route, we observe a sequential order in the introduction of several modifications. This suggests that modification circuits could control the tRNA<sup>Phe</sup> maturation process in yeast. We next adopted a reverse genetic approach and investigated the interplay between the different modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup> with both NMR and mass spectrometry and show that modification circuits identified in the yeast extract on tRNA<sup>Phe</sup> also influence the process of tRNA modification in living cells.

## Results

**Monitoring RNA modifications in cellular extracts with NMR.** In order to investigate the different steps along the maturation pathway of post-transcriptionally modified RNAs, we sought to implement NMR-based methods for monitoring the introduction of modifications in RNA substrates. As a general concept, we believed

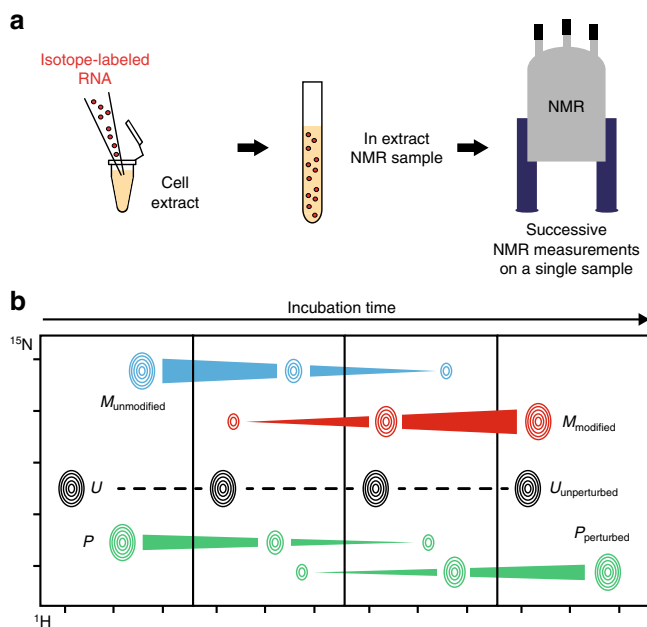
that modification reactions by RNA-modifying enzymes could be probed by NMR in cell extracts containing enzymatic activities responsible for the modification of the RNA substrate of interest. Introducing isotope-labeled RNAs into unlabeled cell extracts combined with the use of isotope-filters in NMR experiments enables the detection of the sole RNA of interest within the complex cell extract environment. The non-disruptive nature of NMR provides the means to directly monitor RNA modification events in a continuous and time-resolved fashion, by measuring successive NMR experiments on a single sample (Fig. 1a). In addition, since NMR spectroscopy provides information at atomic-resolution, multiple RNA modifications introduced on the same substrate, e.g. methylations on nearby nucleotides, can be easily distinguished.

Our approach for monitoring of RNA post-transcriptional modifications with NMR relies on the fact that imino signals of RNAs are very sensitive to their chemical environment. Imino groups are carried by uridines and guanosines, and are easily observed in <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N correlation spectra on condition that the imino proton is protected from exchange with the solvent by hydrogen bonding in, e.g. a Watson–Crick-like pairing. Different types of behavior for imino signals can in principle be observed in <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N correlation spectra upon enzymatic modifications (Fig. 1b). The incorporation of a chemical group on a defined nucleotide will affect the chemical environment of the modified nucleotide itself but also of nearby nucleotides. Overall, this will cause the progressive disappearance of signals from the unmodified RNA and the correlated appearance of new signals from the modified RNA. For the sake of clarity, the disappearance and the correlated appearance related to the imino signal of a nucleotide experiencing a chemical modification will be thereafter called ‘a direct effect’ (signal M on Fig. 1b), whereas the disappearance and the correlated appearance associated with the imino signal of a nearby nucleotide will be referred to as ‘an indirect effect’ (signal P on Fig. 1b). The possibility to observe indirect effects enables the detection of modifications on adenosines and cytosines, even though they do not carry imino groups.

## Yeast tRNA<sup>Phe</sup> as a model for monitoring RNA modifications.

As a proof of concept, we undertook the investigation of the maturation of the yeast tRNA<sup>Phe</sup> in yeast extract. Matured tRNA<sup>Phe</sup> contains 14 modified nucleotides (Fig. 2a and Supplementary Table 1), among which: (i) T54, Ψ55, and D16 are found in almost all yeast tRNAs; (ii) m<sup>1</sup>A58, m<sup>2</sup>G26, m<sup>2</sup>G10, Ψ39, m<sup>7</sup>G46, and m<sup>5</sup>C49 are frequently found in yeast tRNAs; and (iii) Gm34, yW37, and m<sup>5</sup>C40 are found uniquely in tRNA<sup>Phe</sup> in yeast<sup>1</sup>. To evaluate the ability of yeast extracts to modify yeast tRNA<sup>Phe</sup>, we first produced an unmodified <sup>15</sup>N-labeled tRNA<sup>Phe</sup> by in vitro transcription (Fig. 2a), which to a certain extent can be regarded as a tRNA<sup>Phe</sup> precursor (pre-tRNA<sup>Phe</sup>) with processed 5'- and 3'-termini and spliced intron, but lacking all RNA modifications. This choice of substrate affects the introduction of certain modifications near the anticodon<sup>28</sup>, but constitutes a simplified system, which has the advantage to spotlight nucleotide modifications over RNA processing steps. The chemical shifts of imino groups involved in secondary and tertiary interactions were assigned using standard NMR procedures for RNAs<sup>29</sup>. NMR-fingerprints of tRNAs can be efficiently acquired with <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N Band-selective excitation short-transient Transverse relaxation optimized spectroscopy (BEST-TROSY) experiments<sup>30</sup>. To serve as a reference spectrum of yeast tRNA<sup>Phe</sup> without any modifications, we measured a <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N BEST-TROSY experiment in vitro (Fig. 2b), in a buffer aiming to approach cellular conditions. We next incubated this tRNA at 30 °C for 12 h in yeast cellular extracts prepared under mild conditions in order to preserve most enzymatic activities of the cell. Cellular extracts





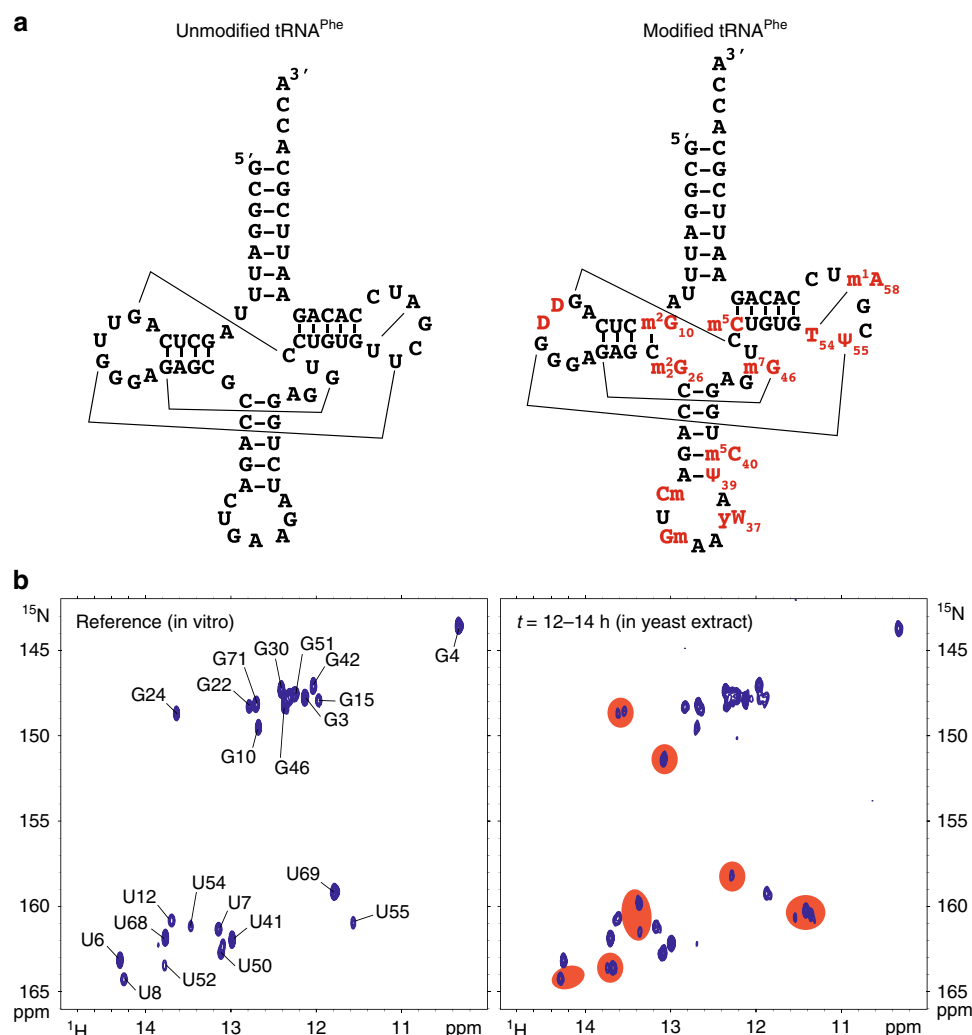
**Fig. 1** Schematic description of the method. **a** An isotope-labeled RNA (represented as red dots) is introduced in cell extracts in an NMR tube to yield an in extract NMR sample. Successive NMR measurements on a single sample incubated directly in the NMR spectrometer can then be performed. **b** RNA modifications are monitored on the RNA imino signals with 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) NMR spectra in a time-resolved fashion. Modifications cause the progressive disappearance of imino signals from unmodified nucleotides (signal M disappearing in blue) and the correlated appearance of new imino signals from modified nucleotide (signal M appearing in red). Modifications also cause disappearance and correlated appearance of imino signals of nearby nucleotides (signal P in green). Nucleotides far away from modification sites have unperturbed imino signals over time (signal U in black)

were supplemented with enzymatic cofactors, such as S-adenosyl-L-methionine (SAM), the almost universal methyl donor of RNA methylations by methyltransferases<sup>31</sup> (MTases), and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), a hydride donor implicated in the reduction of uridines to dihydrouridines<sup>32</sup>. After the 12 h of incubation, we measured a BEST-TROSY experiment (experimental time of 2 h) directly in yeast extracts. The  $^{15}\text{N}$ -isotope filter of the experiment enables the exclusive detection of the  $^{15}\text{N}$ -labeled tRNA<sup>Phe</sup> signals, even in this complex environment (Fig. 2b). The comparison of this spectrum with the reference spectrum revealed obvious differences, with apparent additional signals, as well as duplicated or shifted signals (Fig. 2b). Remarkably, tRNA signals are still observed after this long incubation, confirming that tRNA transcripts are not rapidly degraded by RNases down to single nucleotides and are stable for several hours in yeast extracts<sup>28</sup>. In addition, the line-width of the NMR signals is not particularly broadened in the extracts, meaning that the overall tumbling time of the  $^{15}\text{N}$ -labeled tRNA<sup>Phe</sup> is unchanged compared with the in vitro situation, and therefore that it remains mostly free and does not predominantly associate with proteins or other cellular components within large molecular complexes. These two hurdles, namely substrate degradation and signal line broadening, were identified in a pioneer study as the most prominent difficulties that complicate in depth investigations of nucleic acids with NMR in cellular environments<sup>33</sup>. We did not face these difficulties in the case of tRNA transcripts in yeast extracts, which opened the way to a thorough investigation of the fate of tRNAs throughout their maturation pathway with NMR.

Changes in the NMR-fingerprint of tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 2b) can be associated with expected chemical modifications. For instance the signal of U55, a residue that gets modified into  $\Psi$ 55 and that is found near two other modified nucleotides, i.e. T54 and m<sup>1</sup>A58, gave rise to three individual signals (Fig. 2a, b). Another example comes from the signal of G24, which is split into two (Fig. 2b), and for which the appearance of the second signal could be linked to the m<sup>2</sup>G10 modification, since the G24:C11 base pair stacks over this modified nucleotide (Fig. 2a). However, the exact assignments of all the changes on the NMR-fingerprint of tRNA<sup>Phe</sup>, which are potentially generated by direct and indirect effects from all modifications, remains impractical only from the signal assignments of the initial unmodified tRNA transcript. We thus performed further investigations by NMR in order to accurately interpret these changes on the NMR-fingerprint of tRNA<sup>Phe</sup> upon incubation in yeast extracts.

**The NMR signature of individual modifications.** To characterize the effect of modifications on the NMR-fingerprint of tRNA<sup>Phe</sup>, we measured NMR spectra on three distinct tRNA<sup>Phe</sup> samples differing in their modification content. The first sample is the aforementioned tRNA<sup>Phe</sup> sample produced by in vitro transcription, which presents none of the modifications (Fig. 3a, left). The second sample corresponds to native tRNA<sup>Phe</sup> purified from *Saccharomyces cerevisiae*, and therefore contains all 14 modifications found in fully modified yeast tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 3a, right). The third sample corresponds to a recombinant yeast tRNA<sup>Phe</sup> produced in and purified from an *Escherichia coli* strain overproducing this tRNA with a system previously described<sup>34,35</sup>. Since *E. coli* has a less prolific but related tRNA modification machinery than *S. cerevisiae*, the modification pattern of this sample resembles that of the fully modified yeast tRNA<sup>Phe</sup>, but overall exhibits fewer modifications (Fig. 3a, center). The modification status of a tRNA expressed in heterologous systems can be inferred from the transposition of the known tRNA modification patterns found in the host organism onto the recombinant tRNA sequence. This approach predicts that yeast tRNA<sup>Phe</sup> produced in *E. coli* contains eight modifications, six of which are identical to the ones found in natural tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 3a). This modification pattern was confirmed by further NMR analysis of the sample.

We next performed the chemical shift assignments of the imino groups of the two modified tRNA<sup>Phe</sup> samples, produced in *E. coli* and yeast, with the same approach used for the unmodified tRNA<sup>Phe</sup> sample. Imino protons assignments of the fully modified tRNA<sup>Phe</sup> are consistent with the ones reported by early NMR studies of this tRNA<sup>36,37</sup>. Chemical shifts assignments of the imino groups of the three samples are reported on  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  BEST-TROSY experiments measured in identical conditions in Fig. 3b. The comparison of the NMR fingerprints of the three samples revealed the NMR signature of individual modifications (Fig. 3c). The identified direct effects and indirect effects are reported in Fig. 3c with solid line arrows and dashed line arrows, respectively. NMR signatures of modifications in the anticodon loop could not be identified on this type of NMR spectra, since their imino protons are not engaged in base pairing and are not protected from exchange with the solvent, and are therefore not detectable. For the identification of the NMR signature of modifications, the 3D structure of yeast tRNA<sup>Phe</sup> provided a valuable aid, enabling the precise identification of the nearest modifications to an imino group<sup>38</sup>. The identified NMR signatures (Fig. 3c) might seem puzzling if one looks at the 2D cloverleaf representation of tRNAs, but become more apparent if one has in mind the complicated 3D L-shaped structure of tRNAs (Supplementary Fig. 1). As an example, we describe a few NMR signatures of individual modifications derived from the

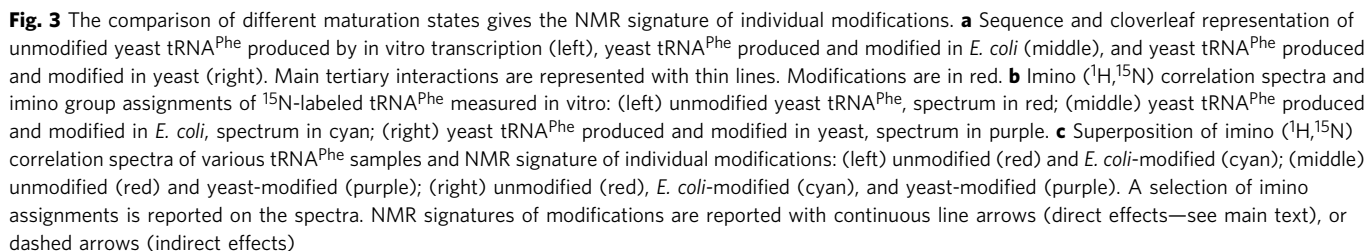


**Fig. 2** Modification of yeast tRNA<sup>Phe</sup> in yeast extract. **a** Sequence and cloverleaf representation of unmodified yeast tRNA<sup>Phe</sup> (left) and modified tRNA<sup>Phe</sup> (right). Main tertiary interactions are represented with thin lines. Modifications are in red. **b** (left) Imino (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N) correlation spectrum of a <sup>15</sup>N-labeled unmodified tRNA<sup>Phe</sup> measured in vitro in a buffer approaching physiological conditions (see “Methods” section). Assignments of the imino groups are reported on the spectrum. (right) Imino (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N) correlation spectrum of a <sup>15</sup>N-labeled tRNA<sup>Phe</sup> measured after 12 h of incubation at 30 °C in yeast extract. The most obvious changes as compared with the spectrum of the unmodified tRNA<sup>Phe</sup> are highlighted with red patches

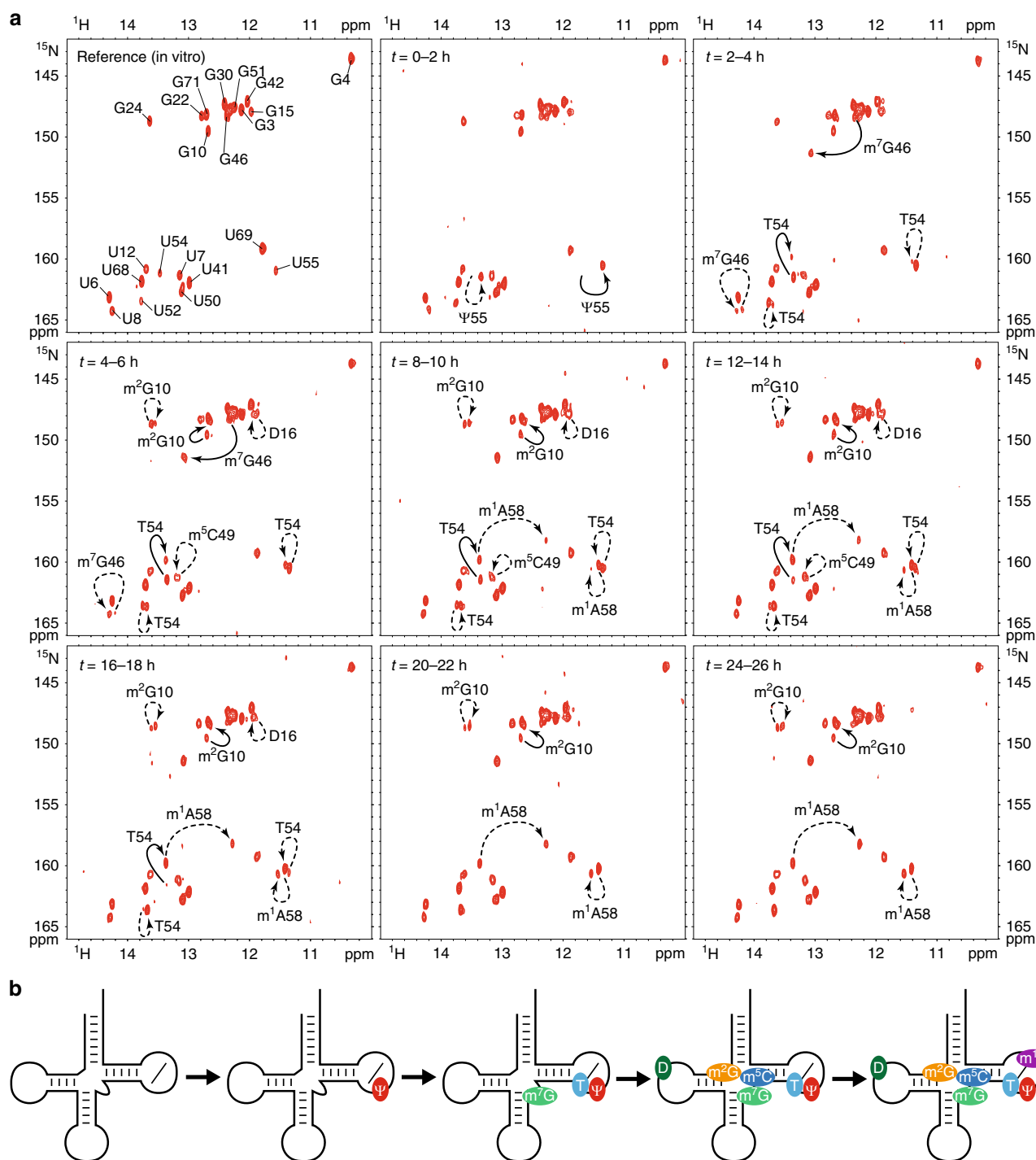
comparison of the NMR fingerprints. For instance, the comparison of the unmodified with the *E. coli*-produced tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 3c, left) reveals the NMR signature of the T54 modification, with a direct effect on the imino group of U54 (solid line) and an indirect effect on U52 (dashed line). Moreover, the comparison of the NMR fingerprints of the three samples (Fig. 3c, right) reveals an NMR signature for the m<sup>1</sup>A58 modification, with an indirect effect on the imino group of T54 (dashed line). The indirect effect is very pronounced in this case, most probably because T54 forms a non-canonical base pair with A58, the chemical environment of which is highly perturbed by the positive charged appearing on the A58 base after methylation at position 1. Similarly, the comparison of the unmodified with the *E. coli*-produced tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 3c, left) reveals the NMR signature of the Ψ55 modification, with a direct effect on the imino group of U55 (solid line); and the comparison of the NMR-fingerprints of the three samples (Fig. 3c, right) reveals an NMR signature for the m<sup>1</sup>A58 modification, with an indirect effect on the imino group of Ψ55 (dashed line). Overall, we identified the NMR signatures for nine modifications, most of which are located in the tRNA core, i.e. m<sup>2</sup>G10, D16, and m<sup>2</sup>G26 in the D-arm; m<sup>5</sup>C40 in the anticodon-arm; m<sup>7</sup>G46 in the variable region; and m<sup>5</sup>C49, T54, Ψ55, and m<sup>1</sup>A58 in the

T-arm (Fig. 3). This paved the way to a detailed investigation of the introduction of RNA modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup> by NMR.

**Time-resolved NMR monitoring of RNA modifications.** In order to record time-resolved snapshots along the tRNA<sup>Phe</sup> modification pathway, we incubated the unmodified <sup>15</sup>N-labeled tRNA<sup>Phe</sup> at a concentration of 40 μM in active yeast extract supplemented with the modification enzymes cofactors SAM and NADPH. The incubation was done at 30 °C directly in an NMR tube in the NMR spectrometer, and a series of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N BEST-TROSY experiments were measured from initial mixing time up to ~24 h after starting the monitoring of tRNA maturation (Fig. 4a). At this concentration of <sup>15</sup>N-labeled tRNA, reasonable signal-to-noise ratio (SNR) is achieved with an acquisition time of 2 h, and therefore each NMR fingerprint measurement spreads over a 2 h time period (Fig. 4a). Importantly, all changes observed in the NMR-fingerprints can be rationalized and attributed to specific RNA modifications on the basis of the NMR signatures identified above (Fig. 3). The identifications of specific RNA modification in each snapshot are displayed with solid line and



such as m<sup>1</sup>A58. Second, some modifications are introduced during a short interval of time, such as  $\Psi$ 55 and m<sup>7</sup>G46, whereas others are introduced over a long time period, such as T54 and m<sup>2</sup>G10, suggesting different levels of intrinsic catalytic activities



**Fig. 4** Time-resolved NMR monitoring of RNA modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup>. **a** Imino (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N) correlation spectra of a <sup>15</sup>N-labeled tRNA<sup>Phe</sup> measured in vitro (first top left spectrum—same as Fig. 2b left) and in a time-resolved fashion during a continuous incubation at 30 °C in yeast extract over 26 h (remaining eight spectra). Each NMR spectrum measurement spreads over a 2 h time period, as indicated. Modifications detected at the different steps are reported with continuous line arrows for direct effects, or dashed arrows for indirect effects (see main text for the distinction between direct and indirect effects). **b** Schematic view of the sequential order of the introduction of modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup> as observed with NMR. Each modification is associated with a defined color also used in Figs. 5 and 6

for the different modification enzymes. In detail, the time-resolved NMR monitoring of RNA modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup> reveals that the modification Ψ55 is the first one to be introduced and that U55 is completely modified before any other modification can be detected (Fig. 4a, *t* = 0–2 h), showing that Pus4 is one of the most active modification enzymes in yeast and suggesting that it is highly efficient on a non-modified tRNA

transcript and does not require prior modifications. Then, m<sup>7</sup>G46 and T54 are the two next modifications to be introduced (Fig. 4a, *t* = 2–4 h), and whereas m<sup>7</sup>G46 is rapidly fully modified (*t* = 2–6 h), T54 is introduced over a longer time period (*t* = 2–18 h), suggesting that Trm2 is a less active enzyme than the Trm8–Trm82 complex. The three next modifications to be observed in the sequence are m<sup>2</sup>G10, m<sup>5</sup>C49, and D16 (Fig. 4a,

$t = 4\text{--}6\text{ h}$ ). Among these three enzymes, the complex responsible for the introduction of the  $m^2G10$  modification (Trm11–Trm112) appears to be the least active one. Even though the T54 modification is observed earlier in the time-course of modification, the three modified nucleotides  $m^2G10$ ,  $m^5C49$ , and D16 are initially detected at a time point, where U54 is not completely converted into T54, meaning that these modifications could, in principle, be introduced on tRNAs lacking the T54 modification. The strict sequential introduction of  $m^2G10$ ,  $m^5C49$ , and D16, only after T54 is fully present is also compatible with our data, since ensemble-averaged measurements do not allow us to discriminate between these two possibilities (see below). The last modification to be detected along the tRNA maturation pathway is the  $m^1A58$  modification (Fig. 4a,  $t = 8\text{--}10\text{ h}$ ). Similarly, the  $m^1A58$  modification is initially detected at a time point, where U54 is not completely modified into T54, meaning that it could, in principle, be introduced on tRNAs lacking the T54 modification. However, our data suggest that the  $m^1A58$  modification is strictly introduced after T54. Indeed, we detect the  $m^1A58$  modification by its indirect effect on the T54 imino group signal (Fig. 3c). If the  $m^1A58$  modification is introduced on a tRNA lacking the T54 modification, it would be detected by a large perturbation on the U54 imino group that would then resonate at a different position than that of T54 ( $\delta_H = 12.27\text{ ppm}$ ;  $\delta_N = 158.2\text{ ppm}$ ), since it lacks the T54 modification. Importantly, no unidentified transient signal, which could correspond to tRNAs with  $m^1A58$  but still lacking T54, is observed during the incubations. The  $m^1A58$  modification of U54-containing tRNAs is therefore not observed in our experiments, suggesting a strict introduction of  $m^1A58$  after T54.

As a summary, the sequence in the introduction of modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup> as monitored by NMR is schematically represented in Fig. 4b. Two modifications for which NMR signatures have been identified (Fig. 3c) were not observed with these conditions and incubation time, namely  $m^2G26$  and  $m^5C40$ . The lack of the  $m^5C40$  modification was expected, since it was reported to strictly depend on the presence of the intron at the level of the anticodon region<sup>28</sup>. Taken as a whole, we clearly observed a sequential order in the introduction of the modifications found in the heart of the 3D structure of yeast tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 4b), which could suggest that regulatory circuits are controlling the introduction of these modifications. However, since the modification content observed by NMR is averaged over the total tRNA<sup>Phe</sup> population, the exact modification status of each tRNA molecule cannot be firmly established. This type of questions that needs to be addressed at a single molecule level, cannot be resolved with currently available methods aimed at quantifying the modification content of RNAs. For instance, in our case it is not possible to know whether or not all  $m^2G10$ -containing tRNAs also contain T54 and  $m^7G46$  modifications. Importantly, with our experimental setup, it is difficult to discriminate between an authentic dependence on the prior introduction of certain modifications and a sequential order caused by different intrinsic catalytic activities of the enzymes. In order to address these important questions concerning tRNA maturation and identify potential interdependencies among RNA modifications, we have adopted a reverse genetic approach and conducted a systematic analysis of tRNA<sup>Phe</sup> maturation in different yeast strains.

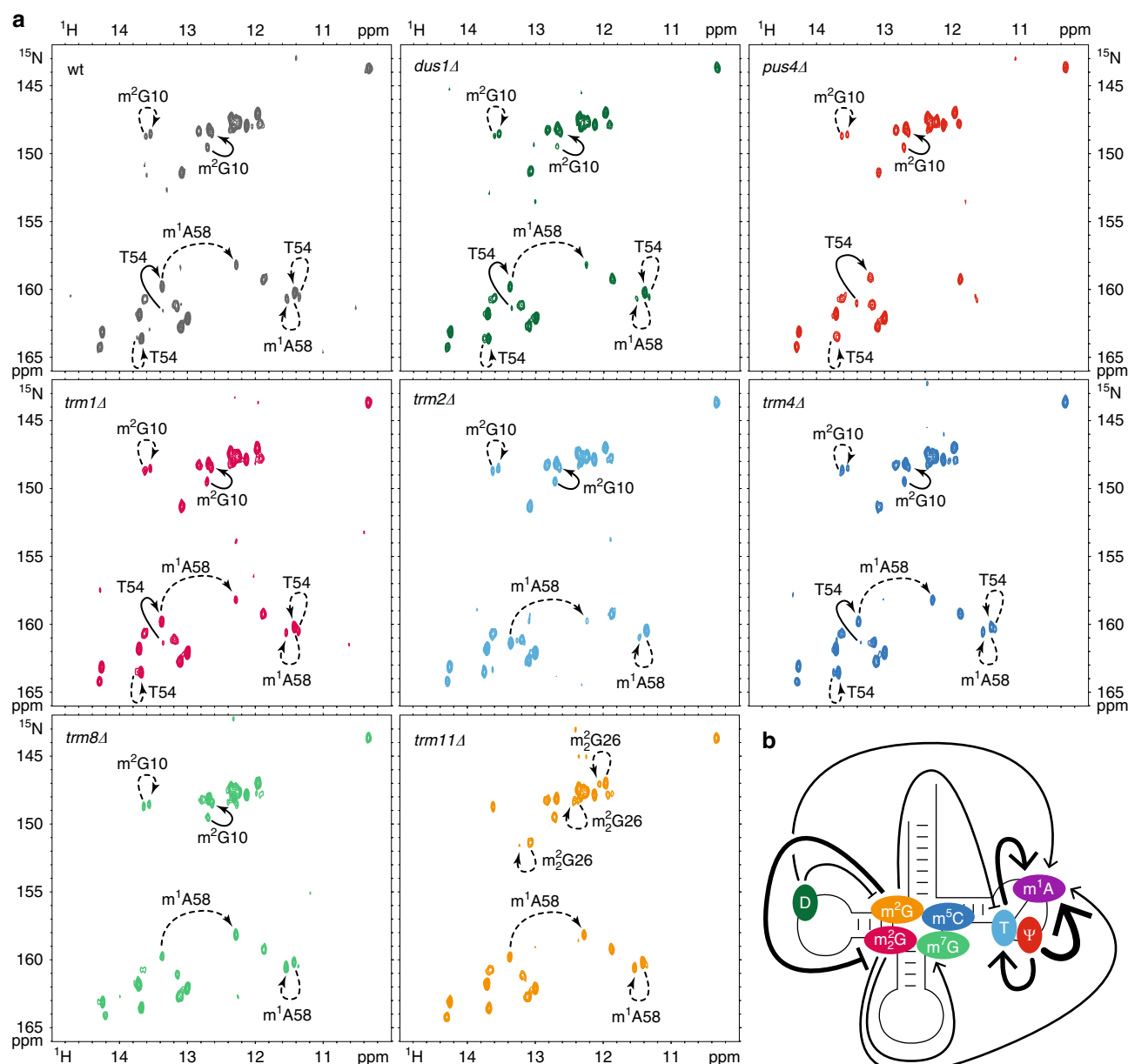
**Complex circuits of RNA modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup>.** In order to identify a potential interplay between different modification enzymes, we recorded several time-resolved snapshots of the tRNA<sup>Phe</sup> modification pathway in identical conditions as in Fig. 4, with the exception that the unmodified <sup>15</sup>N-labeled

tRNA<sup>Phe</sup> was incubated in various extracts prepared from yeast strains depleted of one specific modification enzyme at a time (Fig. 5a and Supplementary Figs. 2–8). The modification pattern was then compared with that of the wild-type yeast extract (Fig. 4). First, this provided independent confirmation of the NMR signatures of the individual modifications identified previously, since changes in the NMR spectra associated with a given modification were no longer observed in the corresponding depleted yeast extract. Second, the detailed analysis of the different profiles of the tRNA<sup>Phe</sup> modification pathways, provided a way to visualize any subtle interdependence between the multiple modification events. To identify these correlated changes, it is best to compare the whole series of snapshots measured in the wild-type and depleted yeast extracts side by side (Fig. 4a and Supplementary Figs. 2–8). However, for ease of visualization, a single time point, intermediate in the time-course of the tRNA<sup>Phe</sup> modification pathway, and at which most of the differences between the wild-type and depleted strains are apparent, is shown in Fig. 5a.

Very strong effects are seen in some cases, as for instance in the case of the *pus4Δ* strain, where not only the Ψ55 modification is absent after a long incubation in the corresponding yeast extract, as expected, but the  $m^1A58$  modification is absent as well. In addition, the incorporation of T54 is substantially hindered in the *pus4Δ* strain. Likewise, the incorporation of  $m^1A58$  is much reduced in the *trm2Δ* strain (preventing T54 formation), which altogether suggest a regulatory circuit in the T-arm of tRNA<sup>Phe</sup>. In this circuit of modification, Ψ55 has a positive effect on the introduction of T54 and  $m^1A58$  by their respective enzymes (Supplementary Table 1), and T54 has a positive effect on the introduction of  $m^1A58$  (Fig. 5b). Another strong effect is observed in the case of the *trm11Δ* strain (preventing  $m^2G10$  formation), where the  $m^2G26$  modification is apparent after ~14 h of incubation in the *trm11Δ* yeast extract, but is undetectable in wild-type and all other depleted strain extracts after ~24 h of incubation. Therefore,  $m^2G10$  has a negative effect on the introduction of  $m^2G26$  (Fig. 5b). Less drastic effects are also apparent in the different time-courses of the tRNA<sup>Phe</sup> modification pathway (Fig. 4a and Supplementary Figs. 2–8), and reveal more subtle interplay in the introduction of certain modifications. For instance, dihydrouridines introduced in the D-arm by Dus1 are seen to have a positive effect on the introduction of  $m^1A58$  in the T-arm and a negative effect on the introduction of  $m^2G10$  in the D-arm (Fig. 4a and Supplementary Fig. 2). Moreover,  $m^2G26$  has a positive effect on the introduction of the nearby  $m^7G46$  but also on the more distant  $m^1A58$  in the T-arm (Fig. 4a and Supplementary Fig. 4). Our analysis has revealed a complex interplay between different modifications in the tRNA core, with the introduction of some modifications appearing to be strongly coupled (Fig. 5b). We next set out to analyze these modification circuits in vivo.

**Modification circuits in other yeast tRNAs.** The modification circuits identified here in yeast extracts are very clear, but we wanted to rule out the possibility that these interdependences could be the consequence of monitoring the modification pathways in yeast extracts, in which numerous cellular activities are present but many others are likely missing. In addition, we wondered whether the modification circuits uncovered here on tRNA<sup>Phe</sup> are specific to this tRNA or whether they are relevant to tRNA modifications in general. To address these two points, we undertook to quantify the modification content of total yeast tRNAs prepared from different yeast strains depleted of one specific modification enzyme at a time. The absolute quantification of the different modified nucleosides was performed by liquid-chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) and compared with the modification content of wild-type yeast cultured under the same experimental conditions.

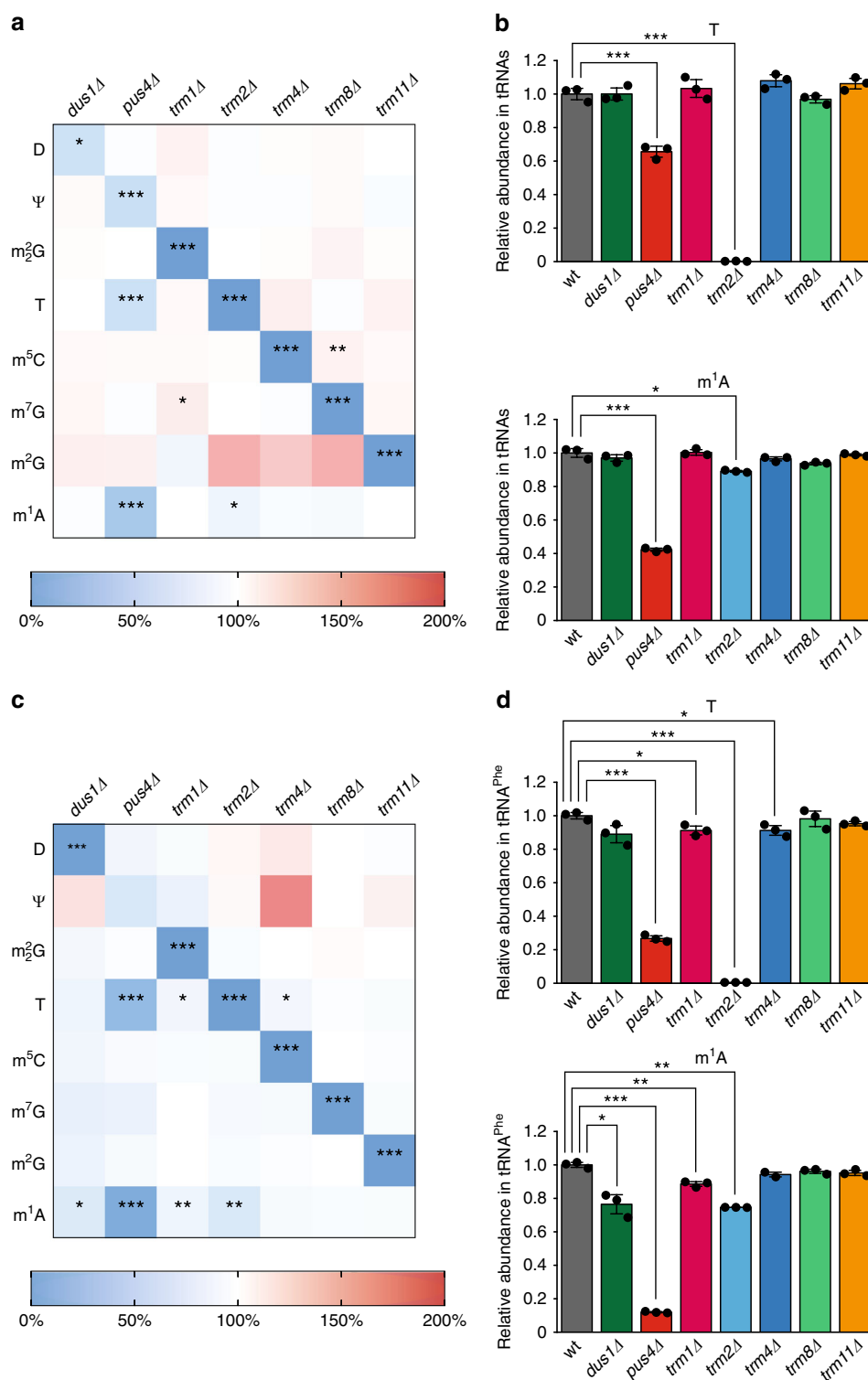




**Fig. 5** Complex modification circuits in yeast tRNA<sup>Phe</sup>. **a** Imino (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N) correlation spectra of a <sup>15</sup>N-labeled tRNA<sup>Phe</sup> measured after 16 h of incubation at 30 °C in yeast extracts prepared from wild-type cells (top left spectrum) and in yeast extracts depleted of one modification enzyme at a time, namely *dus1Δ*, *pus4Δ*, *trm1Δ*, *trm2Δ*, *trm4Δ*, *trm8Δ*, and *trm11Δ*. Each NMR spectrum measurement spreads over a 2 h time period (*t* = 16–18 h). Complete series of time-resolved NMR monitoring of tRNA<sup>Phe</sup> maturation in the different depleted yeast extracts are given in Supplementary Figs. 2–8. Modifications occurring at this specific step in each extract are reported with continuous line arrows for direct effects, or dashed arrows for indirect effects. Each strain is associated with a defined color also used in panel **b**. **b** Schematic view of the modification circuits revealed by the NMR monitoring of tRNA<sup>Phe</sup> maturation in the different yeast extracts of panel **a**. Each modification is displayed on the cloverleaf structure with its associated color also used in Figs. 4 and 6. Arrows indicate stimulatory effects and blunted lines inhibitory effects. Thick and thin lines indicate strong and slight effects, respectively

Modification abundances were quantified by isotope dilution mass spectrometry<sup>39</sup> for the following modifications: D, Ψ, m<sup>2</sup>G, T, m<sup>5</sup>C, m<sup>7</sup>G, m<sup>2</sup>G, and m<sup>1</sup>A in wild-type and depleted strains as used for the NMR monitoring in yeast extracts, namely *dus1Δ*, *pus4Δ*, *trm1Δ*, *trm2Δ*, *trm4Δ*, *trm8Δ*, and *trm11Δ* (Fig. 6). Their quantification in total tRNAs (Fig. 6a, b) reflects the sum of the individual modification changes in all tRNA species and therefore alterations specific to a single tRNA are most probably averaged out and masked in these measurements. Substantial changes in the tRNA modification contents of depleted strains therefore reflect changes that must be common to several tRNA species. Apart from the expected loss of modifications corresponding to

the depleted gene itself, significant alterations in the modification content of total tRNAs were measured in the *pus4Δ* and *trm2Δ* strains (Fig. 6a, b and Supplementary Fig. 9). In the *pus4Δ* strain, both the levels of T and m<sup>1</sup>A are much reduced, whereas in the *trm2Δ* strain, the level of m<sup>1</sup>A is slightly but significantly reduced (Fig. 6b). This shows that the effects we have observed with NMR in yeast extracts on tRNA<sup>Phe</sup> (namely that Ψ55 has a positive effect on the introduction of T54 and m<sup>1</sup>A58, and T54 has a positive effect on the introduction of m<sup>1</sup>A58) also occur in vivo and must be present in several tRNAs. Our measurements clearly establish the existence of a conserved modification circuit involving T54, Ψ55, and m<sup>1</sup>A58 in the T-arm of tRNAs in yeast, but



the extent to which a given tRNA is responsive to this circuit is likely to be tRNA-species-dependent (see the “Discussion” section). Apart from this modification circuit in the T-arm, other more subtle interdependences detected by NMR on tRNA<sup>Phe</sup> were not observed on total tRNAs (Figs. 5 and 6a, b), which led us to quantify the modification content of specifically purified tRNA<sup>Phe</sup> prepared from these same total tRNA samples. The number of modified nucleosides in tRNA<sup>Phe</sup> from wild-type yeast is shown in Supplementary Fig. 10, while the relative abundance is shown in Fig. 6c, d and Supplementary Fig. 11). Similarly to

what was observed for total tRNAs, the levels of T and m<sup>1</sup>A in the purified tRNA<sup>Phe</sup> samples confirm interdependence of modifications in the T-arm of tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 6c, d and Supplementary Fig. 11). It is worth noting that the effects on the T and m<sup>1</sup>A levels in the *pus4Δ* strain are even more pronounced for tRNA<sup>Phe</sup> than in total tRNAs, with almost no m<sup>1</sup>A detected in this strain in tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 6b, d). In addition, dihydrouridines introduced by Dus1 in the D-arm and m<sup>2</sup>G26 introduced by Trm1 have both a positive effect on the introduction of m<sup>1</sup>A58 in the T-arm (Fig. 6d). These effects were also observed by NMR in yeast



**Fig. 6** Quantitative analysis of nucleoside modifications in yeast tRNAs with LC-MS/MS. **a** Heat map depicting the relative comparison of normalized modification levels in total yeast tRNAs prepared from depleted strains (*dus1Δ*, *pus4Δ*, *trm1Δ*, *trm2Δ*, *trm4Δ*, *trm8Δ*, and *trm11Δ*) using the wild-type levels as reference. The nucleotides quantified by LC-MS/MS are listed on the left side of the map. The scale bar indicates the fold change in modification levels compared with the wild-type strain (increased levels shown as red, no change as white, and decreased levels as blue). **b** Histograms showing the relative abundance of T and m<sup>1</sup>A modifications in total yeast tRNAs prepared from the depleted strains using the wild-type levels as reference. **c** Heat map depicting the relative comparison of normalized modification levels in specifically purified yeast tRNA<sup>Phe</sup> prepared from the depleted strains using the wild-type levels as reference. The scale bar indicates the fold change as in panel **a**. **d** Histograms showing the relative abundance of T and m<sup>1</sup>A modifications in specifically purified yeast tRNA<sup>Phe</sup> prepared from the depleted strains using the wild-type levels as reference. In panels **b** and **d**, black dots represents individual measurements, data heights represent the mean of the biological replicates. Error bars correspond to the s.d. In all panels, significant changes compared to wild type are reported as \*\*\* for  $p < 0.001$ , \*\* for  $p < 0.01$  and \* for  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . All other changes are not statistically significant. Statistical analyses of the variations compared to the wild-type strain were performed using a two-sided Student's *t*-test. See also Supplementary Figs. 9 and 11 for similar analysis of all modified bases in total tRNA and purified tRNA<sup>Phe</sup>. Modifications were quantified in three independent biological replicates, except for the modifications Ψ, m<sup>7</sup>G, and m<sup>1</sup>A in the specifically purified tRNA<sup>Phe</sup> of the *trm4Δ* strain, for which  $n = 2$ . Source data are provided as a Source Data file

extracts (Fig. 5). Finally, our mass spectrometry (MS) measurements suggest other small effects that were not detected by NMR in yeast extracts, such as m<sup>2</sup>G26 and m<sup>5</sup>C modifications, which both have a slight but significant positive effect on the introduction of T54 (Supplementary Fig. 11). Overall, the quantification of modifications performed here with MS demonstrates that interdependences between modifications observed by NMR in yeast extracts on tRNA<sup>Phe</sup> also occur in yeast *in vivo* and that some of these modification circuits are not limited to tRNA<sup>Phe</sup> but are common to several yeast tRNAs.

## Discussion

In this study, we developed an original methodology for monitoring the introduction of modified nucleotides in tRNAs using NMR in a time-resolved fashion. Our methodology enabled us to demonstrate that the modifications in yeast tRNA<sup>Phe</sup> are introduced in a particular order and that there are complex interplays between certain modifications. In particular, modifications T54, Ψ55, and m<sup>1</sup>A58 in the T-arm are strongly interconnected in a circuit of modifications that drives the modification process along a defined route, namely Ψ55, then T54 and finally m<sup>1</sup>A58. Our study has important implications for our understanding of the regulation of tRNA modifications in yeast. These aspects are discussed below.

By monitoring the introduction of modifications in tRNAs in a time-resolved fashion with NMR, our methodology enables the identification of sequential events and therefore reveals potential regulatory circuits in the system under study. If the introduction of a certain modification is influenced by the presence of prior modifications, this dependency indeed drives a defined order in the introduction of these modifications. Only a handful of modification circuits have been reported to date, most probably because their study remains difficult, since monitoring the maturation of tRNA in real-time at a single nucleotide level is technically challenging<sup>18</sup>. Most of the well-documented examples of modification circuits occur in the ACL and involve modifications at the frequently modified positions 34 and 37<sup>1,4</sup>. Although the reasons for which modification circuits exist in tRNAs are not known, it was recently proposed that the first modifications act as additional recognition elements for other modifying enzymes, which provides the mean for adding modifications with considerable variation in the ACL<sup>14</sup>. This theory is highly convincing for modifications in the ACL, but cannot account for the modification circuit identified here in the T-arm of yeast tRNAs. The three modifications involved are indeed highly conserved, with T54 and Ψ55 being present in all but the initiator tRNA in yeast (the specific case of tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> is discussed below), and the m<sup>1</sup>A58 modification being present in about two-thirds of yeast cytosolic tRNAs<sup>1</sup>. Similarly, other small effects uncovered here in tRNA<sup>Phe</sup>, for instance the dihydrouridines in the D-arm and the m<sup>2</sup>G26

modification, which have a positive influence on the introduction of the m<sup>1</sup>A58 modification in the T-arm (Fig. 5 and Supplementary Fig. 11), cannot be explained by the need for an increased modification variability in the tRNA core, since these modifications are also highly conserved in yeast tRNAs. The modification circuits uncovered here in the tRNA core of yeast tRNAs are reminiscent of the circuits that have been reported in *Thermus thermophilus* tRNAs<sup>40–42</sup>. Although different in the exact nature of the connections between modifications, both the modification circuits revealed here in yeast and those found in *T. thermophilus* involve conserved modifications from the tRNA core and link modifications from several tRNA regions such as the T- and D-arms<sup>42</sup>. In the case of *T. thermophilus*, the modification circuits influence and regulate the levels of modifications in response to changes in external temperature, a mechanism that has been linked to an adaptation of protein synthesis to temperature change<sup>43</sup>. Whether the circuits identified here in yeast are part of a regulatory mechanism for adaptation to environmental changes is a stimulating idea that deserves further studies.

It is worth noting the self-coherence of the modification circuits reported here in yeast tRNAs. For instance, the branch D → m<sup>2</sup>G10 → T54 → m<sup>1</sup>A58 is consistent, regarding the influence of the dihydrouridine modifications on the m<sup>1</sup>A58, with the direct branch D → m<sup>1</sup>A58 (Fig. 5b). Similarly, the branch Ψ55 → T54 → m<sup>1</sup>A58 is consistent with the direct branch Ψ55 → m<sup>1</sup>A58 (Fig. 5b). It should be remembered that the type of global analysis that we carried out here with NMR or MS, cannot distinguish direct from indirect effects. The effects that appear in the form of a short-branch circuit might therefore be indirect effects arising from accumulated direct effects in a long-branch circuit with identical endpoints. To discriminate direct from indirect effects is an important point that could be addressed *in vitro* by performing careful enzymology with purified enzymes and tRNA substrates bearing or not pre-existing modifications. Among other techniques, this approach could be implemented with NMR using different types of labeling, e.g. <sup>15</sup>N-labeling of the tRNA substrate and a similar experimental setup as presented here, or <sup>13</sup>C-labeling of the transferable methyl of the SAM cofactor and a monitoring of the modification process with <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C correlation spectra showing the incorporation of the methyl groups into the tRNA substrate. However, whether some of the effects observed here are direct or indirect does not radically change their fundamental quality: a connection exists between two modifications.

If one compares the effects of modifications observed with NMR on tRNA<sup>Phe</sup> (Fig. 5) and those measured by MS on total tRNAs (Fig. 6a and Supplementary Fig. 9), it seems reasonable to conclude that the identity of the tRNA has an influence on the conservation and the intensity of a given modification circuit. Apart from the effects of the Ψ55 → T54 → m<sup>1</sup>A58 modification circuit in the T-arm, the other effects observed on tRNA<sup>Phe</sup> with

NMR are not apparent in the MS analysis of total tRNAs. This means that these particular effects are not found in all the different tRNAs but are averaged out and therefore are not detected in the total tRNA population. The observed differences are not derived from potential discrepancies between NMR and MS analysis, since the MS measurements on purified tRNA<sup>Phe</sup> are more similar to the NMR measurements than the MS data on total tRNAs (Figs. 5 and 6 and Supplementary Figs. 9 and 11). This conclusion is corroborated by the difference in the absolute quantification of modified nucleosides performed by MS on total tRNA and purified tRNA<sup>Phe</sup>. As a comment, it is worth mentioning that the differences that exist between the NMR and MS measurements on purified tRNA<sup>Phe</sup> can have two different origins. First, they can reflect the fact that cell extracts do not fully recapture the enzymatic activities of intact cells, especially regarding protein localization (see below). Second, our approach examines the de novo synthesis of modifications on an unmodified tRNA with NMR and the steady-state levels of modifications in mature tRNAs with MS. Differences can therefore arise from the fact that the relatively weak effects on rates of modifications detected by NMR during de novo synthesis might not give rise to significant changes in the steady-state levels of modified nucleosides measured with MS. Concerning the role of tRNA identity, it has been proposed that some modifications might matter more in certain tRNA species than in others<sup>44</sup>. Our data are consistent with the extension of this idea to the connections between modifications, meaning that modification circuits may have more pronounced effects in certain tRNA species than in others. From a mechanistic point of view, this means that for a certain tRNA species, which is an intrinsically poor substrate of a given enzyme, decent modification activity is only achieved in the presence of a prior modification. Whereas for another tRNA species, an intrinsically good substrate of the same enzyme, the presence of a prior modification, although beneficial, has only a minor effect on the catalysis. In such a situation, the modification circuits would have a more pronounced effect on the first tRNA species than on the second one. In accordance with this idea, in the Ψ55–T54–m<sup>1</sup>A58 modification circuit in the T-arm, which is certainly conserved in several tRNAs (Fig. 6b), the strength of the connections most likely depends on the identity of the tRNA. The effects observed in the *pus4Δ* and *trm2Δ* strains are indeed more pronounced on tRNA<sup>Phe</sup> than on total tRNAs (Fig. 6b, d), meaning that the effects of these circuits are necessarily less pronounced on other tRNA species. It is important to mention here that this reasoning can be safely applied in this particular case, since the m<sup>1</sup>A58 and T54 modifications are the only source of m<sup>1</sup>A and T in yeast tRNAs<sup>1</sup>.

Although these extract-based NMR measurements may not accurately reflect the spatially controlled enzyme activities of intact cells, they nevertheless permit comparative assessments of global RNA modification activities and their changes upon depletion of a specific modification enzyme. In other words, even though our NMR approach might be biased by the lack of compartmentalization, by the use of a relatively high concentration of substrate tRNA (40 μM) that stretches the modification process over an artificial time span, by an intrinsic decay of enzymatic activities during incubation that is likely enzyme-dependent, and by the fact that the transcription is here dissociated from the modification process, it enables the identification of connections between modifications. In support of our methodology, most of the modification circuits identified in extracts with NMR have been corroborated by MS data on tRNAs purified from living yeast cells. The most striking difference between the NMR-derived circuits and the MS measurements concerns the strong negative influence of m<sup>2</sup>G10 on the introduction of m<sup>2</sup>G26 observed with NMR, a connection which is

absent from the MS data (Figs. 5 and 6). We believe that the significant inhibition observed in NMR describes a true reduction of the Trm1 activity in the presence of m<sup>2</sup>G10, an effect that is perfectly compatible with the three-dimensional structure of yeast tRNA<sup>Phe</sup>, in which m<sup>2</sup>G10 and m<sup>2</sup>G26 stack on one another (Supplementary Fig. 1)<sup>38</sup>. However, this situation might never arise in cells as a consequence of the subcellular localization of the different enzymes. Indeed, Trm11 (responsible for m<sup>2</sup>G10) is a cytoplasmic protein whereas Trm1 (producing m<sup>2</sup>G26) is a nuclear protein, and since the m<sup>2</sup>G26 formation is insensitive to the presence of the intron, the m<sup>2</sup>G26 modification most likely occurs before the primary export of tRNAs to the cytoplasm (Supplementary Table 1)<sup>45–47</sup>. The m<sup>2</sup>G26 modification is thus introduced on tRNAs lacking the m<sup>2</sup>G10 modification, and in the light of our data it is tempting to speculate that Trm11 is localized in the cytoplasm to avoid it inhibiting the m<sup>2</sup>G26 modification. In another example, the subcellular location of Trm2 is unknown<sup>8</sup>, but there is indirect evidence of an m<sup>5</sup>U54-methylation activity in the nucleus, and Trm2 is therefore thought to be, at least partially, a nuclear protein<sup>48–50</sup>. Our data perfectly agree with a nuclear Trm2 protein. In the *trm2Δ* strain, the levels of m<sup>1</sup>A, introduced at position 58 by the Trm6/Trm61 nuclear complex<sup>51</sup>, are indeed slightly but significantly reduced (Fig. 6b, d). This means that the T54 modification has a slight positive effect on the introduction of m<sup>1</sup>A58, an effect that is incompatible with a situation, where tRNAs would be modified first with m<sup>1</sup>A58 in the nucleus by Trm6/Trm61 and modified by Trm2 in the cytoplasm after tRNA export.

In this study, we report a robust modification circuit in the T-arm of yeast tRNAs, with Ψ55 positively influencing the introduction of both T54 and m<sup>1</sup>A58, and T54 positively influencing the introduction of m<sup>1</sup>A58 (Figs. 5 and 6). This modification circuit was initially postulated based on the ordered modification process revealed by the time-resolved monitoring of tRNA<sup>Phe</sup> modifications in yeast extracts (Fig. 4). A survey of the tRNA<sup>Phe</sup> modification process in yeast extracts using radiolabelled nucleotides and 2D chromatography on thin-layer plates to identify modified nucleotides has been previously reported<sup>28</sup>. Several aspects of the reported kinetics are in accordance with our observations, with for instance the pseudouridine modifications being the fastest modification introduced, but the ordered modification process in the T-arm was not identified. The T54 modification is indeed introduced with no lag-phase, arguing for T54 being a modification that does not require any prior modification. Unfortunately the m<sup>1</sup>A58 modification was not detected in their experimental conditions, preventing the examination of a potential ordered modification process involving this nucleotide<sup>28</sup>. We believe it is worth emphasizing that our methodology has the advantage of providing information on modifications within their sequence context, meaning that one can differentiate, for instance, the m<sup>5</sup>C40 from the m<sup>5</sup>C49 modification, or the different pseudouridine modifications, information that is absent when tRNAs are digested down to nucleotides before analysis. Since nucleotides 54, 55, and 58 are almost absolutely conserved as U54, U55, and A58 in tRNA genes, and since these positions are often modified to T54, Ψ55, and m<sup>1</sup>A58 in the three domains of life<sup>4,52</sup>, it would be interesting to understand whether the T54–Ψ55–m<sup>1</sup>A58 modification circuit identified in yeast, is conserved in other organisms. *E. coli* lacks m<sup>1</sup>A58 modifications in its tRNAs, but interestingly, the enzyme catalyzing the Ψ55 modification in *E. coli* (TruB) prefers to bind unmodified tRNA, whereas the enzyme catalyzing the T54 modification (TrmA) binds tRNA containing Ψ55 more strongly (Ute Kothe, personal communication). This suggests that the Ψ55 and T54 modifications are likely introduced in the same order in *E. coli* and yeast. In *T. thermophilus*, complex modification

circuits exist in the T-arm, including the m<sup>1</sup>A58 modification, which is stimulated by T54<sup>53</sup>; the s<sup>2</sup>T54 modification of T54, which is stimulated by m<sup>1</sup>A58<sup>54</sup>; and the s<sup>2</sup>T54 and m<sup>1</sup>A58 modifications, which are negatively regulated by Ψ55<sup>41</sup>. Although the yeast and *T. thermophilus* circuits have the T54 → m<sup>1</sup>A58 branch in common, the two circuits are fairly different. First, in *T. thermophilus*, the m<sup>1</sup>A58 modification is negatively regulated by Ψ55, whereas it is strongly favored by Ψ55 in yeast (Figs. 5 and 6). And second, the connections in *T. thermophilus* lead to slight changes in the modification content of the analyzed tRNAs (±10% compared to wild-type), whereas the strong influence of Ψ55 on m<sup>1</sup>A58 in yeast tRNA<sup>Phe</sup> produces large changes, with the m<sup>1</sup>A58 level in the *pus4Δ* strain decreasing to ~10% of the wild-type level (Fig. 6d). Altogether, even though some connections might be conserved in different species, potential modification circuits in the T-arm of tRNAs are likely organism-dependent.

Finally, it is worth mentioning that the *trm6/trm61* genes, coding for the heterodimer catalyzing the m<sup>1</sup>A58 modification, are among the few genes coding for tRNA modification enzymes that are essential in yeast<sup>6</sup>. It might seem counterintuitive at first sight that the deletion of the *pus4* gene, which causes a dramatic decrease in the level of m<sup>1</sup>A58 in tRNAs (Fig. 6), results in no detectable phenotype in yeast<sup>55</sup>. However, the essentiality of the m<sup>1</sup>A58 modification has been studied in detail and was shown to correspond to an increased and deleterious instability of the initiator tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> when lacking m<sup>1</sup>A58<sup>56,57</sup>. The initiator tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> is the only yeast cytoplasmic tRNA lacking both the T54 and Ψ55 modifications<sup>1</sup>. Yeast tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> has a very peculiar T-loop sequence, and contains unmodified A54 and U55, which together with other features give rise to a particular tRNA elbow structure<sup>58</sup>. Overall, initiator tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> has its own pathway of modification in the T-arm, which does not depend on the T54–Ψ55–m<sup>1</sup>A58 modification circuit identified here, and the level of m<sup>1</sup>A58 in tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> is therefore most likely unaffected in the *pus4Δ* and *trm2Δ* strains.

Overall, our work establishes NMR spectroscopy as an enlightening technique to analyze tRNA modification pathways. Our innovative methodology indeed reports on the sequential order of modification events and provides valuable information on the regulatory circuits in tRNAs. We expect that our NMR-based methodology will be applicable to investigate several aspects of tRNA maturation and RNA modifications in general, such as the dynamic adaptation of RNA modifications in response to environmental changes.

## Methods

**Yeast strains.** Yeast strains used in this study are listed in Supplementary Table 2. The wild-type *S. cerevisiae* BY4741 strain and the YKO collection kanMX strains carrying deletions of the genes for modification enzymes (YML080w, YNL292w, YDR120c, YKR056w, YBL024w, YDL201w, and YOL124c) were obtained from Euroscarf and used for tRNA preparations for MS analysis.

The proteinase-deficient *S. cerevisiae* strain c13-ABYS-86<sup>59</sup> was used for the preparation of yeast extracts used in NMR experiments. Chromosomal deletion of genes coding for modification enzymes (YML080w, YNL292w, YDR120c, YKR056w, YBL024w, YDL201w, and YOL124c) was carried out by homologous recombination in the c13-ABYS-86 genetic background. The kanamycin-resistance cassettes kanMX were amplified by high-fidelity PCR (Phusion, ThermoFisher) from the appropriate YKO collection kanMX strains (Euroscarf) followed by transformation of the DNA into the c13-ABYS-86 strain and selection on plates containing G418 at 300 μg/mL. All strain constructions were verified by PCR using appropriate oligonucleotides (listed in Supplementary Table 3).

**tRNA<sup>Phe</sup> samples for NMR.** Unmodified yeast tRNA<sup>Phe</sup> was prepared by standard in vitro transcription with T7 polymerase with unlabeled NTPs (Jena Bioscience) for unlabeled samples or <sup>15</sup>N-labeled UTP and GTP (Eurisotop) and unlabeled ATP and CTP (Jena Bioscience) for <sup>15</sup>N-[U/G]-labeled samples. The DNA template and T7 promoter primer were purchased from Eurogentec. The transcript was purified by ion exchange chromatography (MonoQ, GE Healthcare) under native conditions, dialyzed extensively against Na-phosphate pH 6.5 1 mM, and refolded by heating at 95 °C for 5 min and cooling down slowly at room

temperature. Buffer was added to place the tRNA<sup>Phe</sup> in the NMR buffer (Na-phosphate pH 6.5 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM), and the sample was concentrated to ~1.5–2.0 mM using Amicon 10,000 MWCO (Millipore).

The yeast <sup>15</sup>N-labeled tRNA<sup>Phe</sup> sample produced in and purified from *E. coli* was prepared following previously published procedures<sup>60</sup>. Briefly, the gene coding yeast tRNA<sup>Phe</sup> was cloned in the pBSTNAV vector (Addgene ID 45801), expressed in LB for unlabeled sample preparation or <sup>15</sup>N-labeled Spectra-9 medium (Eurisotop) for <sup>15</sup>N-labeled sample preparation. After standard procedures of phenol extraction of soluble RNAs, yeast tRNA<sup>Phe</sup> was purified by ion exchange chromatography under native conditions, dialyzed against the NMR buffer and concentrated to ~0.5–1.0 mM.

Unlabeled matured yeast tRNA<sup>Phe</sup> was purchased from Sigma, resuspended in and dialyzed against the NMR buffer and concentrated to 0.8 mM.

**Yeast extract preparation.** Yeasts (c13-ABYS-86 strain) were grown in YEPD medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) for 24 h at 30 °C and harvested by centrifugation. Pellets were stored at –80 °C until further use. Pellets were unfrozen and resuspended in their same weight of lysis buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 0.1 mM) complemented with 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, and 1 μg/mL each of leupeptin, pepstatin, antipain, and chymostatin. Cells were rapidly frozen and lysed in an Eaton pressure chamber<sup>61</sup> at 30,000 psi in a hydraulic press. The homogenate was centrifuged at 30,000 × g for 1 h at 8 °C to remove cellular debris. The supernatant was further centrifuged at 100,000 × g for 1 h at 8 °C. The resulting supernatant (15–20 mg/mL of proteins) was quickly aliquoted and frozen in liquid nitrogen. Aliquots were stored at –80 °C until used. Yeast extracts from the depleted strains were prepared following the same procedure.

**NMR spectroscopy.** All in vitro NMR spectra of yeast tRNA<sup>Phe</sup> were measured at either 38 or 30 °C on Bruker AVIII-HD 600 MHz and AVIII-HD 700 MHz spectrometers (equipped with TCI 5-mm cryoprobes) with 5-mm Shigemi tubes. Imino resonances of the tRNA<sup>Phe</sup> samples were assigned using 2D jump-and-return-echo (<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H)-NOESY<sup>62,63</sup>, 2D (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N)-BEST-TROSY<sup>30</sup>, and standard 2D (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N)-HSQC experiments measured in the NMR buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.5 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) supplemented with D<sub>2</sub>O 5% (v/v). NMR spectra in yeast extracts were measured at 30 °C on Bruker AVIII-HD 700 MHz spectrometer with 5-mm Shigemi tubes. Unmodified <sup>15</sup>N-[U/G]-labeled tRNA<sup>Phe</sup> were prepared at 40 μM in yeast extracts (final concentration of 11 mg/mL of proteins) supplemented with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.5 150 mM, NH<sub>4</sub>Cl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, EDTA 0.1 mM, SAM 4 mM, ATP 4 mM, NADPH 4 mM, and D<sub>2</sub>O 5% (v/v)<sup>64</sup>. This concentration of tRNA<sup>Phe</sup> (40 μM) was chosen to achieve sufficient SNR in NMR measurements while seeking to approach cellular tRNA concentrations (as a comparison, the concentration of total tRNAs have been estimated to 100–200 μM in yeast and 200–350 μM in *E. coli*, with typical concentrations of individual tRNAs of 2–15 μM<sup>65,66</sup>). For monitoring the maturation of tRNA<sup>Phe</sup> in yeast extract, each 2D (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N)-BEST-TROSY experiment was measured with a recycling delay of 200 ms, a SW(<sup>15</sup>N) of 26 ppm, 96 increments for a total experimental time of 120 min. A reference 2D (<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N)-BEST-TROSY spectrum of unmodified tRNA<sup>Phe</sup> was also measured at 303 K in a buffer containing NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.75 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 4 mM, NADPH 4 mM and D<sub>2</sub>O 5% (v/v)<sup>64</sup>. The data were processed using TOPSPIN 3.5 (Bruker) and analyzed with Sparky (<http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>).

**Total tRNA samples from yeast for mass spectrometry.** Total tRNA from *S. cerevisiae* BY4741 wild-type or mutant strains used for mass spectrometry analysis were prepared following previously published procedures<sup>67</sup>. For each strain, all cultures and tRNA preparations were performed in triplicate for statistical analysis. Briefly, the protocol was adapted as follows. Yeast cells were grown in YEPD medium at 30 °C. Yeasts were collected in logarithmic growth phase and washed with water. Pellets were resuspended in one volume of NaCl 150 mM and mixed with two volumes of water-saturated phenol. After mild shaking at room temperature for 30 min, one volume of chloroform was added and the mixture was vortexed for 15 min. The water and phenol phases were separated by centrifugation for 20 min at 8000 × g at 4 °C. RNAs were precipitated from the aqueous phase for 2 h at –20 °C by adding 2.5 volumes of cold ethanol and 0.1 volume of potassium acetate 2 M. RNAs were pelleted by centrifugation at 10,000 × g for 15 min at 4 °C. Dry pellets were resuspended in 400 μL of Tris–HCl pH 8.0 2 M and tRNAs were incubated for 90 min at 37 °C for aminoacyl-tRNA deacylation. RNAs were precipitated with 2.5 volumes of cold ethanol at –20 °C. Pellets were resuspended in 100 μL of Li/K-acetate buffer (lithium acetate 2 M, potassium acetate 0.1 M pH 5.0). After incubation at 4 °C for 20 min, most of the insoluble ribosomal RNAs were eliminated by centrifugation. Soluble tRNAs in the supernatant were recovered by precipitation with 2.5 volumes of cold ethanol. Finally, tRNAs were resuspended in Tris–HCl pH 7.5 1 mM, magnesium acetate 10 mM, and precipitated with 0.1 volume of ammonium acetate 5 M and three volumes of cold ethanol for 2 h at –20 °C. After centrifugation, tRNAs were dissolved in RNase-free water (ThermoFisher). The total tRNA samples prepared with this procedure contains small contaminations of other small RNAs < 200 nts, mainly 5S and 5.8S rRNAs (both the 5S and 5.8S rRNA contain a single pseudouridine in their



sequence and no other modifications). Using size exclusion chromatography (SEC), tRNAs were estimated to account for ~80% of the small RNAs in these samples.

**Specific isolation of yeast tRNA<sup>Phe</sup>.** Yeast tRNA<sup>Phe</sup> was isolated from ~1 µg total tRNA samples (RNAs < 200 nts) with a first step of SEC following previously published procedures<sup>39,68</sup>, and a subsequent purification using T1 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Product no. 65801D) and a DNA probe specific to tRNA<sup>Phe</sup> ([Btt]AAATGGTGC GAATTCTGTGGATCGAACACAGGACCTCCAG ATCTTC, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) as previously reported<sup>69</sup>.

**Digestion of tRNAs to nucleosides.** Total tRNA samples (300 ng for each sample) and the purified tRNA<sup>Phe</sup> samples were digested to single nucleosides for 2 h at 37 °C with alkaline phosphatase (0.2 U, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Phosphodiesterase I (0.02 U, VWR, Radnor, PA, USA), and Benzoylase (0.2 U) in a buffer containing Tris-HCl pH 8.0 5 mM and MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Tetrahydroduran (THU, 0.5 µg from Merck), butylated hydroxytoluene (BHT, 1 µM), and Pentostatin (0.1 µg) were also added to protect modifications. Afterwards samples were filtered through multi-well plates (Pall Corporation, 10 kDa MWCO) at 4 °C for 30 min at 3000 × g to remove digestive enzymes. Stable isotope-labeled internal standard (SILIS, 0.1 volume of 10X solution) from yeast was added for absolute quantification<sup>39</sup>.

**Mass spectrometry.** For quantification, an Agilent 1290 Infinity II equipped with a DAD combined with an Agilent Technologies G6470A Triple Quad system and electrospray ionization (ESI-MS, Agilent Jetstream) was used. Operating parameters were as follows: positive ion mode, skimmer voltage 15 V, cell accelerator voltage 5 V, N<sub>2</sub> gas temperature 230 °C, and N<sub>2</sub> gas flow 6 L/min, sheath gas (N<sub>2</sub>) temperature 400 °C with a flow of 12 L/min, capillary voltage of 2500 V, nozzle voltage of 0 V, and the Nebulizer at 40 psi. The instrument was operated in dynamic MRM mode (individual mass spectrometric parameters for the nucleosides are given in Supplementary Table 4). The mobile phases were: A as 5 mM NH<sub>4</sub>OAc (≥99%, HiPerSolv CHROMANORM<sup>®</sup>, VWR) aqueous buffer, brought to pH = 5.6 with glacial acetic acid (≥99%, HiPerSolv CHROMANORM<sup>®</sup>, VWR) and B as pure acetonitrile (Roth, LC-MS grade, purity ≥ 99.95%). A Synergi Fusion-RP column (Phenomenex<sup>®</sup>, Torrance, CA, USA; Synergi<sup>®</sup> 2.5 µm Fusion-RP 100 Å, 150 × 2.0 mm) at 35 °C and a flow rate of 0.35 mL/min was used. The gradient began with 100% A for 1 min, increased to 10% B by 5 min, and to 40% B by 7 min. The column was flushed with 40% B for 1 min and returned to starting conditions to 100% A by 8.5 min followed by re-equilibration at 100% A for 2.5 additional minutes.

For calibration, synthetic nucleosides were weighed and dissolved to a stock concentration of 1–10 mM. Calibration solutions ranging from 0.25 to 100 pmol for each canonical nucleoside and from 0.0125 to 5 pmol for each modified nucleoside were prepared in water (*D*, *ψ* = 0.025–10 pmol). The calibration solutions were mixed with the yeast SILIS and analyzed by LC-MS/MS. The value of each integrated peak area of the nucleoside was divided through the respective SILIS area. The linear regression for each nucleoside's normalized signal/concentration plot gives the relative response factor for nucleosides (rRFN)<sup>39</sup>. The data were analyzed by the Quantitative and MassHunter Software from Agilent. Finally, the absolute amounts of the modifications were referenced to the absolute amounts of summed canonical nucleosides. The number of modifications per tRNA<sup>Phe</sup> was calculated by determining the amount of injected tRNA from the signal of canonicals and the number of canonicals from the tRNA<sup>Phe</sup> sequence. Statistical analysis of the variations compared to the wild-type strain were performed using a two-sided Student's *t*-test.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

A reporting summary for this Article is available as a Supplementary Information file. The source data underlying Fig. 6 and Supplementary Figs. 9–11 are provided as a Source Data file. All data is available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 2 April 2019 Accepted: 10 July 2019

Published online: 29 July 2019

## References

- Boccalletto, P. et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, D303–D307 (2018).
- Helm, M. & Alfonzo, J. D. Posttranscriptional RNA Modifications: playing metabolic games in a cell's chemical Legoland. *Chem. Biol.* **21**, 174–185 (2014).
- Jackman, J. E. & Alfonzo, J. D. Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 35–48 (2013).
- Machnicka, M. A., Olchowik, A., Grosjean, H. & Bujnicki, J. M. Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA Biol.* **11**, 1619–1629 (2014).
- El Yacoubi, B., Bailly, M. & de Crécy-Lagard, V. Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 69–95 (2012).
- Phizicky, E. M. & Hopper, A. K. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* **24**, 1832–1860 (2010).
- Barraud, P. & Tisné, C. To be or not to be modified: miscellaneous aspects influencing nucleotide modifications in tRNAs. *IUBMB Life* <https://doi.org/10.1002/iub.2041> (2019).
- Hopper, A. K. Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **194**, 43–67 (2013).
- Raina, M. & Ibba, M. tRNAs as regulators of biological processes. *Front. Genet.* **5**, 171 (2014).
- Oberbauer, V. & Schaefer, M. R. tRNA-derived small RNAs: biogenesis, modification, function and potential impact on human disease development. *Genes* **9**, 607 (2018).
- Agris, P. F., Vendeix, F. A. P. & Graham, W. D. tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.* **366**, 1–13 (2007).
- Grosjean, H., de Crécy-Lagard, V. & Marck, C. Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett.* **584**, 252–264 (2010).
- Lorenz, C., Lünse, C. E. & Mörl, M. tRNA modifications: impact on structure and thermal adaptation. *Biomolecules* **7**, 35 (2017).
- Han, L. & Phizicky, E. M. A rationale for tRNA modification circuits in the anticodon loop. *RNA* **24**, 1277–1284 (2018).
- Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T. & He, C. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell* **169**, 1187–1200 (2017).
- Chan, C. T. Y. et al. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet.* **6**, e1001247 (2010).
- Chan, C., Pham, P., Dedon, P. C. & Begley, T. J. Lifestyle modifications: coordinating the tRNA epitranscriptome with codon bias to adapt translation during stress responses. *Genome Biol.* **19**, 228 (2018).
- Helm, M. & Motorin, Y. Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 275–291 (2017).
- Theillet, F.-X. et al. Cell signaling, post-translational protein modifications and NMR spectroscopy. *J. Biomol. Nucl. Magn. Reson.* **54**, 217–236 (2012).
- Smith, M. J. et al. Real-time NMR monitoring of biological activities in complex physiological environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 39–47 (2015).
- Selenko, P. et al. In situ observation of protein phosphorylation by high-resolution NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 321–329 (2008).
- Theillet, F.-X. et al. Site-specific mapping and time-resolved monitoring of lysine methylation by high-resolution NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7616–7619 (2012).
- Theillet, F.-X. et al. Site-specific NMR mapping and time-resolved monitoring of serine and threonine phosphorylation in reconstituted kinase reactions and mammalian cell extracts. *Nat. Protoc.* **8**, 1416–1432 (2013).
- Amata, I. et al. Multi-phosphorylation of the intrinsically disordered unique domain of c-Src studied by in-cell and real-time NMR spectroscopy. *Chembiochem* **14**, 1820–1827 (2013).
- Mylona, A. et al. Opposing effects of Elk-1 multisite phosphorylation shape its response to ERK activation. *Science* **354**, 233–237 (2016).
- Cordier, F. et al. Ordered phosphorylation events in two independent cascades of the PTEN C-tail revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20533–20543 (2012).
- Liokatis, S. et al. Phosphorylation of histone H3 Ser10 establishes a hierarchy for subsequent intramolecular modification events. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 819–823 (2012).
- Jiang, H. Q., Motorin, Y., Jin, Y. X. & Grosjean, H. Pleiotropic effects of intron removal on base modification pattern of yeast tRNA<sup>Phe</sup>: an in vitro study. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2694–2701 (1997).
- Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J. & Schwalbe, H. NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem* **4**, 936–962 (2003).
- Farjon, J. et al. Longitudinal-relaxation-enhanced NMR experiments for the study of nucleic acids in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 8571–8577 (2009).
- Motorin, Y. & Helm, M. RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 611–631 (2011).
- Lombard, M. & Hamdane, D. Flavin-dependent epitranscriptomic world. *Arch. Biochem. Biophys.* **632**, 28–40 (2017).
- Hänsel, R. et al. Evaluation of parameters critical for observing nucleic acids inside living *Xenopus laevis* oocytes by in-cell NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15761–15768 (2009).
- Meinzel, T., Mechulam, Y. & Fayat, G. Fast purification of a functional elongator tRNA<sup>Met</sup> expressed from a synthetic gene in vivo. *Nucleic Acids Res.* **16**, 8095–8096 (1988).
- Tisné, C., Rigourd, M., Marquet, R., Ehresmann, C. & Dardel, F. NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA(Lys)3 expressed in

- Escherichia coli*: identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient initiation of HIV-1 reverse transcription. *RNA* **6**, 1403–1412 (2000).
36. Heerschap, A. et al. Imino-proton resonances of yeast tRNA<sup>Phe</sup> studied by two-dimensional nuclear Overhauser enhancement spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **149**, 649–655 (1985).
  37. Roy, S. & Redfield, A. G. Assignment of imino proton spectra of yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **22**, 1386–1390 (1983).
  38. Shi, H. & Moore, P. B. The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited. *RNA* **6**, 1091–1105 (2000).
  39. Borland, K. et al. Production and application of stable isotope-labeled Internal Standards for RNA modification analysis. *Genes* **10**, 26 (2019).
  40. Tomikawa, C., Yokogawa, T., Kanai, T. & Hori, H. N7-Methylguanine at position 46 (m7G46) in tRNA from *Thermus thermophilus* is required for cell viability at high temperatures through a tRNA modification network. *Nucleic Acids Res.* **38**, 942–957 (2010).
  41. Ishida, K. et al. Pseudouridine at position 55 in tRNA controls the contents of other modified nucleotides for low-temperature adaptation in the extreme-thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2304–2318 (2011).
  42. Hori, H. Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. *Front. Genet.* **5**, 144 (2014).
  43. Hori, H. et al. Transfer RNA modification enzymes from thermophiles and their modified nucleosides in tRNA. *Microorganisms* **6**, 110 (2018).
  44. Phizicky, E. M. & Alfonzo, J. D. Do all modifications benefit all tRNAs? *FEBS Lett.* **584**, 265–271 (2010).
  45. Purushothaman, S. K., Bujnicki, J. M., Grosjean, H. & Lapeyre, B. Trm11p and Trm112p are both required for the formation of 2-methylguanosine at position 10 in yeast tRNA. *Mol. Cell Biol.* **25**, 4359–4370 (2005).
  46. Rose, A. M., Joyce, P. B., Hopper, A. K. & Martin, N. C. Separate information required for nuclear and subnuclear localization: additional complexity in localizing an enzyme shared by mitochondria and nuclei. *Mol. Cell Biol.* **12**, 5652–5658 (1992).
  47. Grosjean, H., Szwedkowska-Kulinska, Z., Motorin, Y., Fasiolo, F. & Simos, G. Intron-dependent enzymatic formation of modified nucleosides in eukaryotic tRNAs: a review. *Biochimie* **79**, 293–302 (1997).
  48. Knapp, G., Beckmann, J. S., Johnson, P. F., Fuhrman, S. A. & Abelson, J. Transcription and processing of intervening sequences in yeast tRNA genes. *Cell* **14**, 221–236 (1978).
  49. Hopper, A. K., Furukawa, A. H., Pham, H. D. & Martin, N. C. Defects in modification of cytoplasmic and mitochondrial transfer RNAs are caused by single nuclear mutations. *Cell* **28**, 543–550 (1982).
  50. Nordlund, M. E., Johansson, J. O., von Pawel-Rammingen, U. & Byström, A. S. Identification of the TRM2 gene encoding the tRNA(m5U54) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **6**, 844–860 (2000).
  51. Macari, F. et al. TRM6/61 connects PKCα with translational control through tRNA<sup>i</sup>(Met) stabilization: impact on tumorigenesis. *Oncogene* **35**, 1785–1796 (2016).
  52. Jühling, F. et al. tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **37**, D159–D162 (2009).
  53. Yamagami, R. et al. Folate-/FAD-dependent tRNA methyltransferase from *Thermus thermophilus* regulates other modifications in tRNA at low temperatures. *Genes Cells* **21**, 740–754 (2016).
  54. Shigi, N. et al. Temperature-dependent biosynthesis of 2-thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA. *J. Biol. Chem.* **281**, 2104–2113 (2006).
  55. Becker, H. F., Motorin, Y., Planta, R. J. & Grosjean, H. The yeast gene YNL292w encodes a pseudouridine synthase (Pus4) catalyzing the formation of psi55 in both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4493–4499 (1997).
  56. Anderson, J. et al. The essential Gcd10p-Gcd14p nuclear complex is required for 1-methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA. *Genes Dev.* **12**, 3650–3662 (1998).
  57. Kadaba, S. et al. Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA<sup>Met</sup> in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* **18**, 1227–1240 (2004).
  58. Basavappa, R. & Sigler, P. B. The 3 Å crystal structure of yeast initiator tRNA: functional implications in initiator/elongator discrimination. *EMBO J.* **10**, 3105–3111 (1991).
  59. Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C. & Wolf, D. H. Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* **10**, 555–562 (1991).
  60. Dégut, C., Monod, A., Brachet, F., Crépin, T. & Tisné, C. In vitro/in vivo production of tRNA for X-ray studies. *Methods Mol. Biol.* **1320**, 37–57 (2016).
  61. Eaton, N. R. New press for disruption of microorganisms. *J. Bacteriol.* **83**, 1359–1360 (1962).
  62. Plateau, P. & Gueron, M. Exchangeable proton NMR without base-line distortion, using new strong-pulse sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7310–7311 (1982).
  63. Sklenar, V. & Bax, A. Spin-echo water suppression for the generation of pure-phase two-dimensional NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **74**, 469–479 (1987).
  64. Freund, J. & Kalbitzer, H. R. Physiological buffers for NMR spectroscopy. *J. Biomol. Nucl. Magn. Reson.* **5**, 321–322 (1995).
  65. Waldron, C. & Lacroute, F. Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J. Bacteriol.* **122**, 855–865 (1975).
  66. Dong, H., Nilsson, L. & Kurland, C. G. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Mol. Biol.* **260**, 649–663 (1996).
  67. de Crécy-Lagard, V. et al. Biosynthesis of wyosine derivatives in tRNA: an ancient and highly diverse pathway in Archaea. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 2062–2077 (2010).
  68. Chionh, Y. H. et al. A multidimensional platform for the purification of non-coding RNA species. *Nucleic Acids Res.* **41**, e168 (2013).
  69. Hauenschild, R. et al. The reverse transcription signature of N-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9950–9964 (2015).

## Acknowledgements

The authors are grateful to Henri Grosjean for stimulating discussions about RNA modifications, Valérie Heurgué-Hamard (IBPC), Josette Banroques (IBPC), Simon Lebaron (CBI), and Sylvie Auxilien (I2BC) for yeast strains, protocols and helpful discussions about yeast handling, Bruno Sargueil for guidance regarding the Eaton press implementation, and Jacqueline Plumbridge (IBPC) for careful reading of the manuscript. This work was supported by grants from the CNRS, the ANR NMR-VitAmin (ANR-14-CE09-0012), the Labex DYNAMO (ANR-11-LABX-0011), the Equipex Cacsice (ANR-11-EQPX-0008) and the SESAME Île-de-France. P.B. and C.T. also acknowledge access to the NMR infrastructure of the Paris Descartes University that is supported by grants from the Région Île-de-France, the European Union (FEDER) and the Paris Descartes University. M.H. and S.K. are grateful for funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KE1943/3-1 and KE1943/4-1).

## Author contributions

C.T. conceived the initial project; P.B. and C.T. refined the project and designed the experiments; P.B. and M.C. prepared tRNA samples for NMR studies; P.B., A.G., and M.C. performed gene deletions in yeast and prepared yeast extracts for NMR studies; P.B. measured and analyzed NMR spectra; A.G. prepared total tRNA samples for MS; M.H. isolated tRNA<sup>Phe</sup> and digested tRNAs for MS; M.H. and S.K. measured and analyzed MS data; P.B. wrote the manuscript; all authors discussed the results, critically reviewed the manuscript and approved the final version.

## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11356-w>.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**Peer review information:** *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

### 3.3 Funktionen von 5-Methylcytidin in mRNA und tRNA

#### Gemeinsamer Prolog

Eine häufig in RNA-Molekülen auftretende Modifikation ist 5-Methylcytidin ( $m^5C$ ). Besonders häufig ist diese in tRNA vorzufinden und befindet sich dort in teilweise mehrfacher Ausführung in der variablen Schleife. Alternativ kann  $m^5C$  in, oder nahe der Anticodon-Schleife vorgefunden werden. Aber auch in anderen RNA-Molekülen wie mRNA, rRNA oder nicht-codierende Sequenzen kann  $m^5C$  detektiert werden. Die Inkorporation wird von einer der acht evolutionär konservierten  $m^5C$ -RNA-Methyltransferasen übernommen: NSUN1–7 und DNMT2. Für einige dieser Methyltransferasen konnte eine Korrelation zu neurologischen Krankheiten festgestellt werden. So wurde in bestimmten Tumor-Zellen beispielsweise ein verringertes Level an NSUN6 vorgefunden, während eine Erhöhung der Enzymmenge eine positive Auswirkung auf die Überlebensrate betroffener Patienten zeigte. Die mechanistischen Grundlagen dieser Enzyme sind jedoch noch größtenteils unerforscht.

In Gkatza *et al.* (*PLoS Biology*, **2019**) wurde die Funktion von NSUN2 in der molekularen Stressantwort genauer betrachtet. Eine Herabregulation des NSUN2-Levels als Reaktion auf oxidativen Stress führte zu verringerter Methylierung spezifischer tRNA-Positionen beispielsweise in tRNA<sup>Leu</sup>. Die fehlende Methylierung wiederum führte zu einer erhöhten Menge an nicht-codierenden Fragmenten aus tRNA-Molekülen (tRF). Diese entstehen durch die Nuklease-Aktivität von Angiogenin, welche eine Abhängigkeit von der entsprechenden Methylierung in tRNA-Molekülen zeigt. Die tRFs hemmen die allgemeine Proteinbiosynthese und führen zu einer katabolischen Reaktion der Zelle. NSUN2 agiert somit als Sensor der Zelle auf oxidativen Stress.

In Selmi *et al.* (*Nucleic Acids Research*, **2020**), konnte das Sequenzmotiv für NSUN6-abhängige Methylierung identifiziert werden. Dies gelang durch eine Variation der miCLIP-Methode (kurz für engl.: methylation dependent individual nucleotide crosslinking immunoprecipitation), welche auf der Fixierung des Enzyms am RNA-Strang, ausgelöst durch eine Punktmutation im katalytischen Zentrum, beruht. Die von NSUN6 methylierten CTCCA-Motive befinden sich größtenteils in der 3'-untranslatierten Region von codierenden Sequenzen. Dort ist die Methylierung vermutlich in den Mechanismus der Qualitätskontrolle, und der Genauigkeit der Translationsterminierung involviert.

### 3.3 Funktionen von 5-Methylcytidin in mRNA und tRNA

„Cytosine-5 RNA methylation links protein synthesis to cell metabolism“, N. A. Gkatza, C. Castro, R. F. Harvey, **M. Heiß**, M. C. Popis, S. Blanco, S. Bornelöv, *et al.*; *PLoS Biology*, **2019**, 17 (6): e3000297.

Autorenbeitrag: Die Aufreinigung von tRNA und speziell tRNA<sup>Leu</sup> für massenspektrometrische Datenerhebung als auch die entsprechende Analyse wurde von mir durchgeführt.

Kopie des Artikels mit Erlaubnis des Verlages: <https://journals.plos.org/plosbiology/>

„Sequence- and structure-specific cytosine-5 mRNA methylation by NSUN6“, T. Selmi, S. Hussain, S. Dietmann, **M. Heiß**, K. Borland, S. Flad, J.-M. Carter, *et al.*; *Nucleic Acids Research*, **2021**, 49 (2): 1006–1022.

Autorenbeitrag: Die Aufreinigung von tRNA und 18S rRNA für die massenspektrometrische Datenerhebung als auch die entsprechende Analyse wurde von mir durchgeführt. Entsprechende Studien in mRNA wurden von Kayla Borland durchgeführt.

Kopie des Artikels mit Erlaubnis des Verlages: <https://global.oup.com/?cc=de>



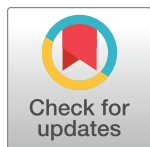
RESEARCH ARTICLE

# Cytosine-5 RNA methylation links protein synthesis to cell metabolism

Nikoletta A. Gkatza<sup>1</sup>, Cecilia Castro<sup>2</sup>, Robert F. Harvey<sup>3</sup>, Matthias HeiB<sup>4</sup>, Martyna C. Popis<sup>1</sup>, Sandra Blanco<sup>5,6</sup>, Susanne Bornelöv<sup>7</sup>, Abdulrahim A. Sajini<sup>8</sup>, Joseph G. Gleeson<sup>9</sup>, Julian L. Griffin<sup>2</sup>, James A. West<sup>2</sup>, Stefanie Kellner<sup>4</sup>, Anne E. Willis<sup>3</sup>, Sabine Dietmann<sup>7</sup>, Michaela Frye<sup>1,10\*</sup>

**1** Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **2** Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **3** Medical Research Council Toxicology Unit, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **4** Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany, **5** Cancer Cell Signaling and Metabolism Lab, Proteomics Unit CIC bioGUNE, Derio, Spain, **6** Molecular Mechanisms Program, Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-University of Salamanca, Salamanca, Spain, **7** Wellcome-Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **8** Department of Biomedical Engineering, Khalifa University of Science and Technology, Abu Dhabi, United Arab Emirates, **9** Department of Neurosciences, San Diego School of Medicine, University of California, La Jolla, California, United States of America, **10** German Cancer Center (Deutsches Krebsforschungszentrum), Heidelberg, Germany

\* [m.frye@dkfz.de](mailto:m.frye@dkfz.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Gkatza NA, Castro C, Harvey RF, HeiB M, Popis MC, Blanco S, et al. (2019) Cytosine-5 RNA methylation links protein synthesis to cell metabolism. *PLoS Biol* 17(6): e3000297. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297>

**Academic Editor:** Jeff Coller, Case Western Reserve University, UNITED STATES

**Received:** July 5, 2018

**Accepted:** May 14, 2019

**Published:** June 14, 2019

**Copyright:** This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) public domain dedication.

**Data Availability Statement:** Data are available from the NCBI dbGaP database of genotypes and phenotype (phs000645.v5.p1) for researchers who meet the criteria for access to confidential data ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study\\_id=phs000645.v5.p1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000645.v5.p1)). Access to the datasets on dbGaP requires a brief description of the proposed use of dbGaP dataset (s). The request is reviewed by the appropriate Data Access Committee. An agreement to the Data Use Certification for the requested dataset(s) is required.

## Abstract

Posttranscriptional modifications in transfer RNA (tRNA) are often critical for normal development because they adapt protein synthesis rates to a dynamically changing microenvironment. However, the precise cellular mechanisms linking the extrinsic stimulus to the intrinsic RNA modification pathways remain largely unclear. Here, we identified the cytosine-5 RNA methyltransferase NSUN2 as a sensor for external stress stimuli. Exposure to oxidative stress efficiently repressed NSUN2, causing a reduction of methylation at specific tRNA sites. Using metabolic profiling, we showed that loss of tRNA methylation captured cells in a distinct catabolic state. Mechanistically, loss of NSUN2 altered the biogenesis of tRNA-derived noncoding fragments (tRFs) in response to stress, leading to impaired regulation of protein synthesis. The intracellular accumulation of a specific subset of tRFs correlated with the dynamic repression of global protein synthesis. Finally, NSUN2-driven RNA methylation was functionally required to adapt cell cycle progression to the early stress response. In summary, we revealed that changes in tRNA methylation profiles were sufficient to specify cellular metabolic states and efficiently adapt protein synthesis rates to cell stress.

## Introduction

Clinical and genetic heterogeneity in diseases such as metabolic disorders and cancer remains a major challenge for targeted therapies. Phenotypic disease variation can be caused by cell type-specific modulation of gene products via both the transcription and translation machineries [1,2]. Recently, the formation of a variety of chemical modifications in RNA emerged as an additional regulatory layer of gene expression programmes [3].

**Funding:** Authors received funding from Cancer Research UK - Senior Cancer Research Fellowship (C10701/A15181) and Cancer Research UK - PhD student stipend (C10701/A16134), [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org); and European Research Council - Consolidator Grant (m5C; 310360), <https://erc.europa.eu/>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: MF is consulting for Storm Therapeutics.

**Abbreviations:** ADMA, asymmetric dimethylarginine; BG, bulge; BS, bisulfite; BS-seq, BS sequencing; CHX, cycloheximide; FC, fold-change; FDR, false discovery rate; HB, hair bulb; HG, hair germ; IFE, interfollicular epidermis; ITGA6, integrin alpha-6; m<sup>5</sup>C, 5-methylcytosine; MS, mass spectrometry; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; NMR, nuclear magnetic resonance; NPM1, nucleophosmin; OP-puro, O-propargyl-puromycin; PCA, principal component analysis; PCAD, P-cadherin; RNA-seq, RNA sequencing; RT, reverse transcription; SAH, S-adenosyl-homocysteine; SAM, S-adenosyl-methionine; SDMA, symmetric dimethylarginine; TCA, tricarboxylic acid; tRF, tRNA-derived fragment; tRNA, transfer RNA; VL, variable loop.

Of the over 170 known RNA modifications, methylation is the most common [4]. In RNA, 5-methylcytosine (m<sup>5</sup>C) is often required for normal development, and its formation is mediated by at least eight highly conserved enzymes (NSUN1–7 and DNMT2) [5]. For instance, loss-of-function mutations in the human *NSUN2* and *NSUN3* genes cause neurodevelopmental and mitochondrial disorders, respectively [6–9]. *NSUN2* methylates transfer RNAs (tRNAs) site-specifically at either the anticodon or variable loop (VL), thereby protecting tRNAs from endonucleolytic cleavage [10,11]. This protection is important to prevent the accumulation of tRNA-derived fragments (tRFs), which would otherwise inhibit protein synthesis [11–13].

Phenotypically, the loss of *NSUN2* thus leads to an expansion of low translating stem and progenitor populations in skin and brain [11,12,14]. Low protein synthesis in slowly cycling or quiescent stem cells saves energy and prevents premature exhaustion [12,15–17] and is required to maintain a fully functional stem cell state by enhancing resilience towards differentiation cues [12].

The precise mechanisms linking external stresses to RNA modifications and protein synthesis have remained largely unknown in mammals. Here, we reveal that one such mechanism is the endogenous and dynamic methylation of RNA by *NSUN2*. Our data show that expression of *NSUN2* is required to metabolically support high protein synthesis rates. By performing a time course that mapped endogenous, stress-induced tRNA methylation, we observed for the first time, to our knowledge, that loss of methylation occurs in a highly site-specific manner as early as 2 hours following an insult. Stress-induced loss of tRNA methylation altered both the fragmentation pattern among tRNAs and protein synthesis rates. Thus, our data reveal how RNA methylation is mechanistically integrated into metabolic homeostasis.

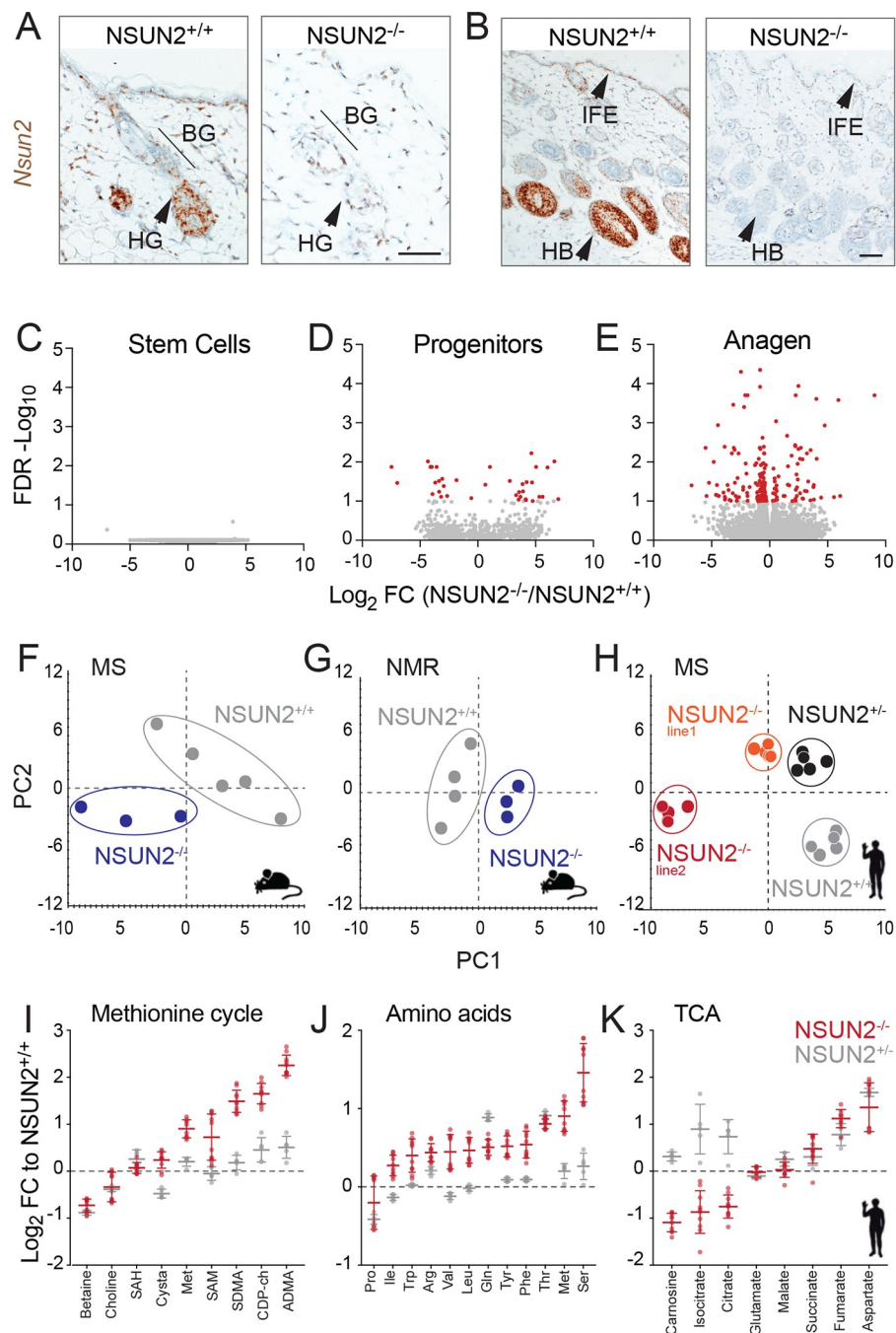
## Results

### NSUN2 regulation of stem cell differentiation is not controlled via transcription

Disruption of the *Nsun2* gene in mice causes global hypomethylation of tRNAs and a developmental growth retardation [5]. The abnormal development of tissues including brain and skin is the result of impaired stem cell differentiation [11,14,18] (S1A and S1B Fig). The expression of *NSUN2* is highly dynamic within tissues. For instance, *NSUN2* is absent in quiescent stem cells in hair follicle bulges (BGs), steadily increases in progenitor cells in the hair germ (HG), and is highest in the growing (anagen) hair bulb (HB) (Fig 1A and 1B).

To dissect the underlying molecular pathways that decrease stem cell sensitivity towards differentiation stimuli in the absence of *NSUN2*, we transcriptionally profiled mouse stem and progenitor cell populations in the hair follicles, as well as hair follicles in the resting (telogen) or growing (anagen) state. Stem and progenitor cells were isolated by flow sorting using the cell surface marker integrin alpha-6 (ITGA6) and then further separated into quiescent stem cells (ITGA6<sup>high</sup>/CD34<sup>+</sup>) and activated, cycling progenitors (ITGA6<sup>low</sup>/P-cadherin [PCAD]<sup>+</sup>) (S1B–S1D Fig) [19–21]. In *Nsun2*–/– mouse skin, quiescent stem cells increase at the expense of activated progenitors (S1B Fig) [12,18]. Transcriptional comparison of stem and progenitor cells isolated from wild-type and *Nsun2*–/– mice revealed that this increase does not appear to be transcriptionally driven (Fig 1C and 1D). Transcriptionally, these cell populations were highly similar, regardless of their expression of *NSUN2* (S1 Data).

Similarly, loss of *NSUN2* in actively growing hair follicles (anagen) that highly express *NSUN2* in wild-type cells (Fig 1B) resulted in the differential expression of just over 100 genes (red) (Fig 1E). Metabolic genes were highly enriched in these few differentially expressed



**Fig 1. Loss of NSUN2 triggers a shift of the metabolic state towards catabolism.** (A, B) Detection of *Nsun2* RNA in *Nsun2*<sup>+/+</sup> and *Nsun2*<sup>-/-</sup> mouse skin in early (A) and late (B) anagen. Scale bar: 50  $\mu$ m. (C-E) Transcriptional changes in skin of wild-type (*Nsun2*<sup>+/+</sup>) and *Nsun2* knockout (*Nsun2*<sup>-/-</sup>) mice. Highlighted in red are significant FC expression differences (FDR < 0.05) in hair follicle stem cells (CD34<sup>+</sup>/ITGA6<sup>high</sup>) (C), progenitor cells (PCAD<sup>high</sup>/ITGA6<sup>low</sup>) (D), and anagen skin (E). (*n* = 3–4 mice per genotype and condition). (F-H) Multivariate analyses of data obtained from MS (F) or NMR spectroscopy-based metabolic profiling (G) using mouse back skin (*n* = 3–5 mice) or human dermal fibroblasts (*n* = 5 samples per genotype) (H). Model parameters: R<sup>2</sup>X = 94.5%, R<sup>2</sup>Y = 99.9%, and Q<sup>2</sup> = 95.8% using partial least square discriminant analysis (F), R<sup>2</sup>X = 70% and Q<sup>2</sup> = 30% (G), and R<sup>2</sup>X = 85.9% and Q<sup>2</sup> = 78.6% (H), using principal component analysis. (I-K) Metabolic differences between NSUN2<sup>+/+</sup> and NSUN2<sup>-/-</sup> normalised to NSUN2<sup>+/+</sup> human dermal fibroblasts relating to the methionine cycle (I), free amino acids (J), and the TCA cycle (K). The underlying data for this figure can be found in S1–S3 Data and S1 File. BG, hair follicle bulge; FC, fold-change; FDR, false discovery rate; HB, hair bulb; IFE, interfollicular epidermis; ITGA6, integrin alpha-6; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; PC1, Principal Component 1; PC2, Principal Component 2; PCAD, P-cadherin; TCA, tricarboxylic acid.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297.g001>

genes, suggesting that changes in metabolism might account for the insensitivity of stem cells to differentiation cues (S1E and S1F Fig).

## NSUN2 regulates metabolism by promoting an anabolic cell state

NSUN2 methylates most tRNAs and a smaller number of noncoding and coding RNAs using S-adenosyl-methionine (SAM) as the methyl donor (S1G Fig) [5,22–24]. SAM and its downstream metabolite, S-adenosyl-homocysteine (SAH), are integral to the one-carbon metabolism encompassing the folate and methionine cycles (S1H Fig). The one-carbon metabolism supports multiple physiological processes, including nucleotide biosynthesis (purines and thymidine), amino acid homeostasis, and the redox defence system [25]. Similar to NSUN2 deletion, dysregulation of the one-carbon metabolism impairs foetal growth and has been linked to neurodevelopmental disorders and cancer [25–27].

We therefore asked whether NSUN2 controlled the one-carbon metabolic cycles that generate the methyl donor required for NSUN2 to modify RNA. We used mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to measure how metabolites were affected by loss of NSUN2. We compared wild-type and *Nsun2*<sup>−/−</sup> mouse skin in anagen, as well as human dermal fibroblasts expressing (*NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>+/-</sup>) or lacking NSUN2 (*NSUN2*<sup>−/−</sup>) (S2 Data) [7]. Multivariate analysis of either the MS or NMR spectroscopic data clearly separated the genotypes (Fig 1F–1H). Therefore, loss of NSUN2 established a distinct cellular metabolic state.

Three major metabolic pathways were affected by deletion of NSUN2: (1) the methionine cycle, (2) amino acid synthetic pathways, and (3) the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Fig 1I–1K; S1I–S1N Fig; S2 Data; S3 Data). First, higher levels of metabolites of the methionine cycle strongly indicated that protein degradation was enhanced in the absence of NSUN2. Cellular metabolism up-regulated methionine and SAM, but not SAH, in response to loss of NSUN2 (Fig 1I). Such an alteration in the stochastic ratio of SAM to SAH can reshape the landscape of protein methylation [28]. In particular, increased levels of free symmetric dimethylarginine (SDMA) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) can only be caused by enhanced protein degradation, because they are generated solely upon proteolysis of methylated proteins [29]. Second, we found substantial enhancement of free amino acid levels in the absence of NSUN2 (Fig 1J; S1J and S1M Fig), indicating a reduced rate of protein synthesis. Third, the changes we observed in the metabolites of the TCA cycle indicated that upon loss of NSUN2, metabolism rebalanced from oxidative phosphorylation towards glycolysis (Fig 1K).

In conclusion, the metabolic changes we observed included increased protein degradation, suppressed protein synthesis, and enhanced glycolysis and together showed that cells lacking NSUN2 are maintained in a catabolic state (S1O Fig).

## Methylation-dependent and -independent NSUN2 functions regulate metabolism

NSUN2-expressing and -lacking mouse epidermal cell populations were metabolically different, but their transcriptomes were highly similar. In contrast, RNA sequencing (RNA-seq) of human NSUN2-expressing and -lacking dermal fibroblasts identified 2,867 differentially expressed genes (S2A and S2B Fig; S4A Data). However, the transcriptome of *NSUN2*<sup>−/−</sup> cells remained largely unaltered when we reexpressed the NSUN2 protein (S2C–S2E Fig; S4B Data), indicating that the differences in gene expression were cell line-specific rather than driven by the presence or absence of NSUN2. To confirm that we indeed rescued tRNA methylation, we reexpressed the wild type (NSUN2), an enzymatic dead version of NSUN2 (K190M), or the empty vector (e.vector) as a control in *NSUN2*<sup>−/−</sup> cells [30]. Quantitative MS



and RNA bisulfite sequencing (BS-seq) confirmed remethylation of NSUN2-specific sites in tRNAs (Fig 2A–2E; S5 Data).

One functional role of m<sup>5</sup>C in tRNAs is to protect from endonucleolytic cleavage by angiogenin [10,11]. To measure the production of tRFs, we performed small RNA-seq in the rescued NSUN2<sup>−/−</sup> cells. Next, we identified all significantly different tRFs between K190M- and NSUN2-expressing cells (*p*<sub>adj</sub> < 0.05) that were unaltered when K190M was compared to the empty vector control (*p*<sub>adj</sub> > 0.75) (Fig 2F; S6 Data). Overexpression of the wild-type but not the enzymatic dead NSUN2 protein rescued the formation of tRFs smaller than 46 nucleotides (Fig 2G and 2H), demonstrating that the biogenesis of distinct tRFs was driven by NSUN2-specific methylation.

Angiogenin-mediated tRNA cleavage inhibits global protein synthesis [31]. Therefore, we next asked how mRNA translation was affected by removal of NSUN2. Polysome profiling confirmed differences in the global abundance of polysomes following NSUN2-removal (Fig 2I; S2F Fig). To quantify de novo protein synthesis, we measured the incorporation of the reporter molecule O-propargyl-puromycin (OP-puro) into nascent polypeptides (S2G Fig) [32]. OP-puro forms covalent conjugates that can be imaged by microscopy and quantified by flow cytometry (S2H Fig). Treatment with cycloheximide (CHX), a potent inhibitor of mRNA translation, served as a positive control [33]. Deletion of NSUN2 repressed protein synthesis (Fig 2J), whereas inhibition of angiogenin was sufficient to up-regulate protein synthesis (S2I Fig). Inhibition of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) using rapamycin down-regulated NSUN2 protein expression but reduced protein synthesis similarly in NSUN2-expressing and -lacking cells (S2J–S2L Fig). Thus, loss of NSUN2 led to decreased protein synthesis rate. Accordingly, reexpression of NSUN2 enhanced de novo protein synthesis, but this effect was independent of its methylation activity (Fig 2K). One explanation for why expression of K190M also led to the up-regulation of protein synthesis might be that its binding protected the unmethylated tRNAs from processing.

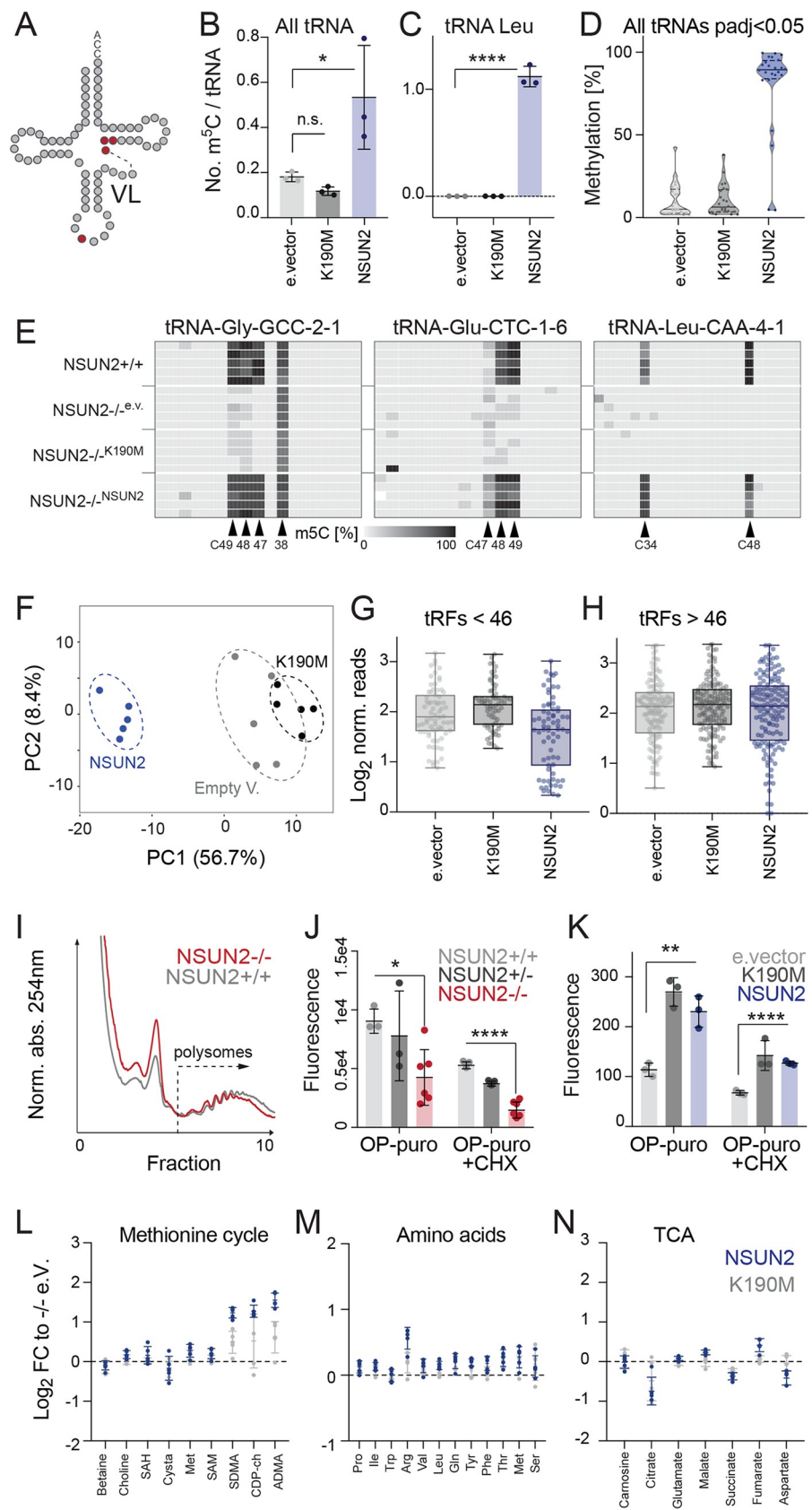
Finally, we asked whether restoring NSUN2-specific methylation sites also affected the one-carbon metabolism. Although reexpression of NSUN2 or K190M significantly altered the metabolic profile of NSUN2<sup>−/−</sup> cells (S2M and S2N Fig), NSUN2 expression was not sufficient to reverse the catabolic cell state (Fig 2L–2N; S7 Data).

Together, NSUN2-dependent methylation protected tRNAs from processing into tRFs, and reexpression of NSUN2 in NSUN2<sup>−/−</sup> cells enhanced protein synthesis in a methylation-independent manner. However, expression of NSUN2 was not sufficient to switch from a catabolic to anabolic cell state.

## NSUN2 functions in the dynamic adaptation of protein synthesis in response to stress

One explanation for why up-regulation of NSUN2 was not sufficient to induce an anabolic cell state was that both tRNA methylation and metabolism normally function in response to external cues. Therefore, we next sought to determine the importance of NSUN2-mediated RNA methylation in response to a changing microenvironment. As a stimulus, we chose stress because NSUN2 is required for the proper cellular response upon stress signals in brain and skin in vivo [11,12].

The dynamic regulation of protein synthesis is an integral part of the cellular stress response [34]. Global protein synthesis is repressed in response to oxidative stress, and translation of mRNAs that encode specific stress-related proteins is enhanced (Fig 3A). Therefore, we analysed how global protein synthesis changed over time in response to stress by measuring OP-puro incorporation (Fig 3B). In NSUN2<sup>+/+</sup> cells, protein synthesis rates changed dynamically



**Fig 2. Methylation-dependent and -independent functions of NSUN2.** (A) Schematic representation of NSUN2-methylated tRNA sites in the anticodon loop (C34) and the VL (C46, C47). (B, C) Number of m<sup>5</sup>C per tRNA in all tRNAs (B) or tRNA leucine (C) quantified by mass spectrometry in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells reexpressing NSUN2, the enzymatic dead version of NSUN2 (K190M), or the empty ('e.v.') vector control. \**p*<sub>adj</sub> < 0.05; \*\*\*\**p*<sub>adj</sub> < 0.0001 (ordinary one-way ANOVA, multiple comparisons). (D) Quantification of m<sup>5</sup>C levels in all rescued tRNAs (*p*<sub>adj</sub> < 0.05) using RNA bisulfite sequencing. (E) Heatmaps of example tRNAs showing the rescued m<sup>5</sup>C sites in five replicates of *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells or *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells reexpressing NSUN2, K190M, or the empty vector ('e.v.'). (F) PCAs of tRFs differentially abundant in NSUN2-overexpressing *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells. (G, H) Log<sub>2</sub> coverage of tRFs smaller than 46 nucleotides (G) or larger than 46 nucleotides (H). (I) Polysome profile of NSUN2-expressing (*NSUN2*<sup>+/+</sup>) and -lacking (*NSUN2*<sup>-/-</sup>) cells. Shown is one out three replicates. (J, K) Protein synthesis levels measured by flow cytometry using OP-puro in the indicated cells. CHX served as a control. Data represent mean, and error bars are ±SD. Student's *t* test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.0001. (L-N) Metabolic differences between *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells overexpressing the NSUN2 or K190 protein normalised ('norm.') to *NSUN2*<sup>-/-</sup> cell infected with the empty vector control ('e.v.') relating to the methionine cycle (L), free amino acids (M), and the TCA cycle (N). The underlying data for this figure can be found in [S5–S7 Data](#) and [S1 File](#). ADMA, asymmetric dimethylarginine; CHX, cycloheximide; FC, fold-change; m<sup>5</sup>C, 5-methylcytosine; OP-puro, O-propargyl-puromycin; PCA, principle component analysis; SAH, S-adenosyl-homocysteine; SAM, S-adenosyl-methionine; SDMA, symmetric dimethylarginine; TCA, tricarboxylic acid; tRF, tRNA-derived fragment; tRNA, transfer RNA; VL, variable loop.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297.g002>

upon sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>) treatment and recovered within 4 hours ([Fig 3C](#); [S3A Fig](#)). *NSUN2*-depleted cells showed attenuated changes to protein synthesis rates ([Fig 3C and 3D](#); [S3A Fig](#)), which we confirmed using fluorescence imaging ([S3B and S3C Fig](#)). Protein synthesis rates of rescued *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells (*NSUN2*) were comparable to *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells and slightly, but not significantly, reduced when the enzymatic dead version of NSUN2 (K190M) was expressed ([Fig 3E](#)).

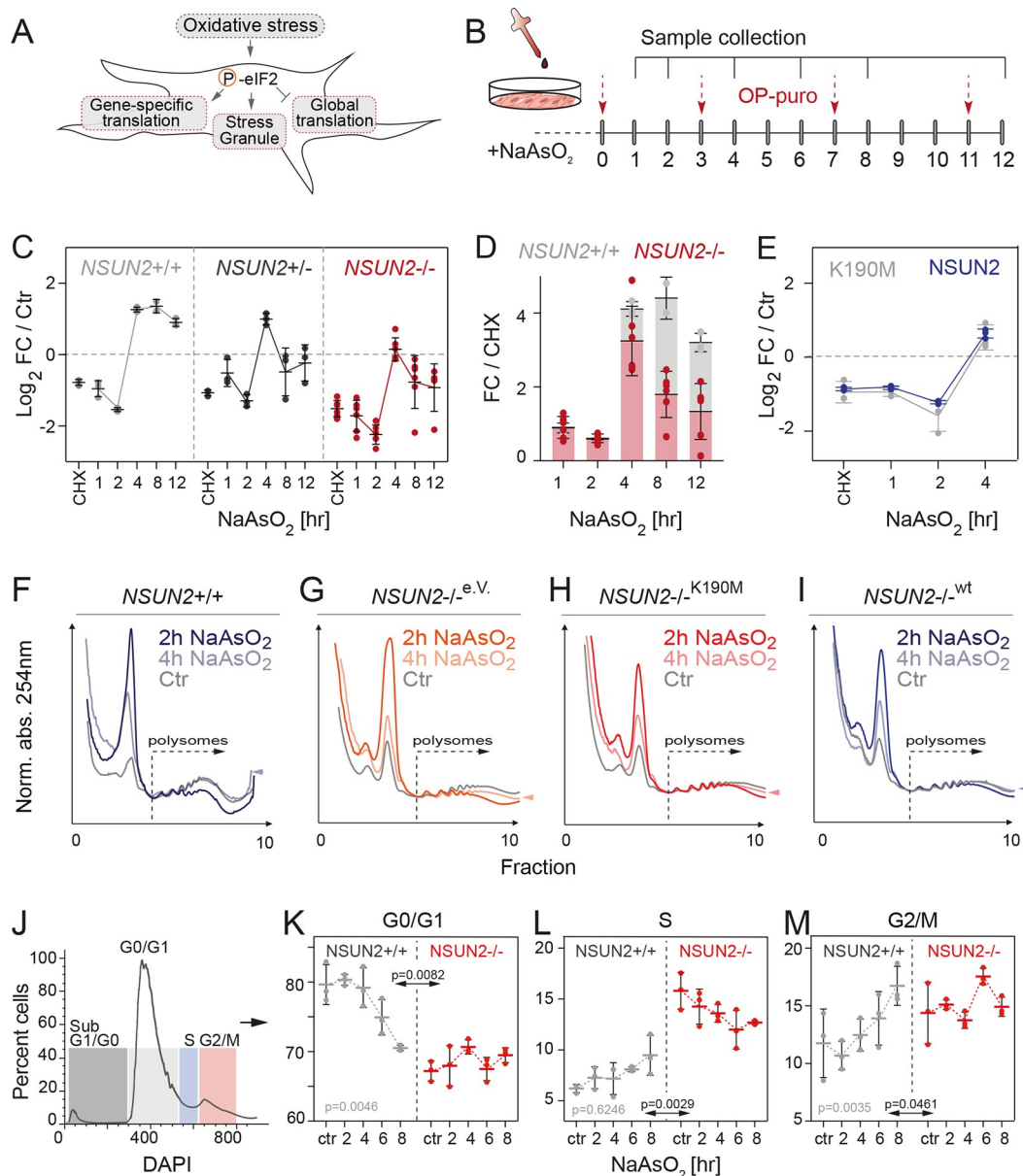
Polysome profiling confirmed a recovery of mRNA translation between 2 and 4 hours of stress ([Fig 3F](#)). We also measured a difference of the heavy polysomes after 4 hours in *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells, which appeared to be less evident in *NSUN2*<sup>-/-</sup> control or K190M-overexpressing cells ([Fig 3F–3H](#); [S3D Fig](#)). *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells rescued with the wild-type NSUN2 protein responded similarly to *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells and recovered the heavy polysomes after 4 hours of stress ([Fig 3F and 3I](#); [S3D Fig](#)).

In summary, cell stress caused a strong but temporary reduction of protein synthesis, which was attenuated by loss of NSUN2.

## NSUN2 functions in the oxidative stress response by altering the cell cycle phases

To test for the functional relevance of NSUN2-regulated protein synthesis rates, we asked what impact NSUN2 deletion had on cell survival, as oxidative modifications to RNA can result in cell death [35]. In both *NSUN2*-expressing and -lacking cells, cell survival began to decrease between 2 and 4 hours after stress exposure, but at these early time points there were no differences in cell death ([S3E–S3G Fig](#)). We then asked whether cell division was affected by the absence of NSUN2, since the lengths of the cell cycle phases can play important roles in cellular adaptation and response to external stress stimuli [36]. For example, cells exposed to sodium arsenite often slow cell cycle progression to facilitate repair of oxidative lesions [37]. To test whether RNA methylation was required for adapting cell cycle to stress, we measured the cell cycle progression of *NSUN2*-expressing and -lacking cells upon exposure to arsenite ([Fig 3J–3M](#); [S3H Fig](#)). In response to stress, the percentage of *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells decreased in the G1/G0-phase but increased in the S-phase and G2/M-phase of the cell cycle ([Fig 3K–3M](#); grey). In contrast, the cell cycle progression of *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells remained stable ([Fig 3K–3M](#); red), indicating that *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells failed to adapt the cell cycle phases to the stress stimulus. A tight regulation of global protein synthesis might be needed to avoid accumulation of proteins during cell cycle arrest and repair.





**Fig 3. NSUN2 functions in the cell cycle to adapt dynamic protein synthesis in response to stress.** (A) Schematic representation how oxidative stress modulates global and gene-specific synthesis. (B) Treatment regime using arsenite to induce stress and OP-puro to measure protein synthesis. (C) Log<sub>2</sub> FC of protein synthesis in *NSUN2*<sup>+/+</sup>, *NSUN2*<sup>+/-</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells in response to stress compared to the untreated controls ('Ctr'). CHX served as a control. (*n* = 2–3 samples per time point). (D) Relative protein synthesis levels in response to stress in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *-/-* cells measured as FC compared to CHX control. (E) Log<sub>2</sub> FC of protein synthesis in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells rescued with NSUN2 or the enzymatic dead version K190M after exposure to stress at the indicated time points. (F–I) Polysome profile of *NSUN2*<sup>+/+</sup> (F) and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells rescued with wt (I) or mutated NSUN2 (K190M) (H). The empty vector ('e.v.')-infected cells served as control (G). Shown is one out of two replicates. (J) Gating used for cell cycle analyses using DAPI incorporation. (K–M) Percentage of *NSUN2*<sup>+/+</sup> (grey) and *NSUN2*<sup>-/-</sup> (red) cells in G0/G1- (K), S- (L), and G2/M- (M) phases of the cell cycle after treatment with sodium arsenite for the indicated time. (*n* = 3 samples per time point). Data presented as mean, error bars ± SD. *p*-Value: two-way ANOVA calculating row (grey; treatment) and column (black; genotype) factor variation. The underlying data for this figure can be found in [S1 File](#). CHX, cycloheximide; eIF2, eukaryotic initiation factor 2; FC, fold-change; Norm. abs., normalised absorbance; OP-puro, O-propargyl-puromycin; wt, wild-type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297.g003>

## Cytosine-5 RNA methylation is a metabolic sensor of external stress

Since the dynamic regulation of protein synthesis was reduced when cells lacked NSUN2 and the down-regulation of global translation is integral to the cellular stress response, we next asked whether NSUN2 acted as a sensor of the external stress stimulus. We measured how endogenous NSUN2 expression was affected by oxidative stress induced by exposure to sodium arsenite (Fig 4A). NSUN2 expression decreased sharply on RNA and protein levels between 1 and 2 hours of sodium arsenite treatment (Fig 4B and 4C), which coincided with the formation of stress granules in the cytoplasm (S4A Fig). Similarly, one stimulus of UVB exposure was sufficient to rapidly reduce *Nsun2* RNA levels in human epidermal and dermal cells (S4B Fig), whereas vehicle control treatments did not affect NSUN2 expression (S4C Fig).

The nucleolus, where NSUN2 resides, can act as a stress sensor [38,39]. Nucleophosmin (NPM1) is a marker for nucleolar stress, and we observed a rapid, strong down-regulation of both NPM1 and NSUN2 upon arsenite treatment (Fig 4C). Additional NSUN family members residing in the mitochondria (NSUN3, NSUN4) and cytoplasm (NSUN6) were similarly repressed in response to arsenite stress (Fig 4C). In conclusion, expression of NSUN2 and at least three of its m<sup>5</sup>C RNA methyltransferase family members were repressed in response to oxidative stress.

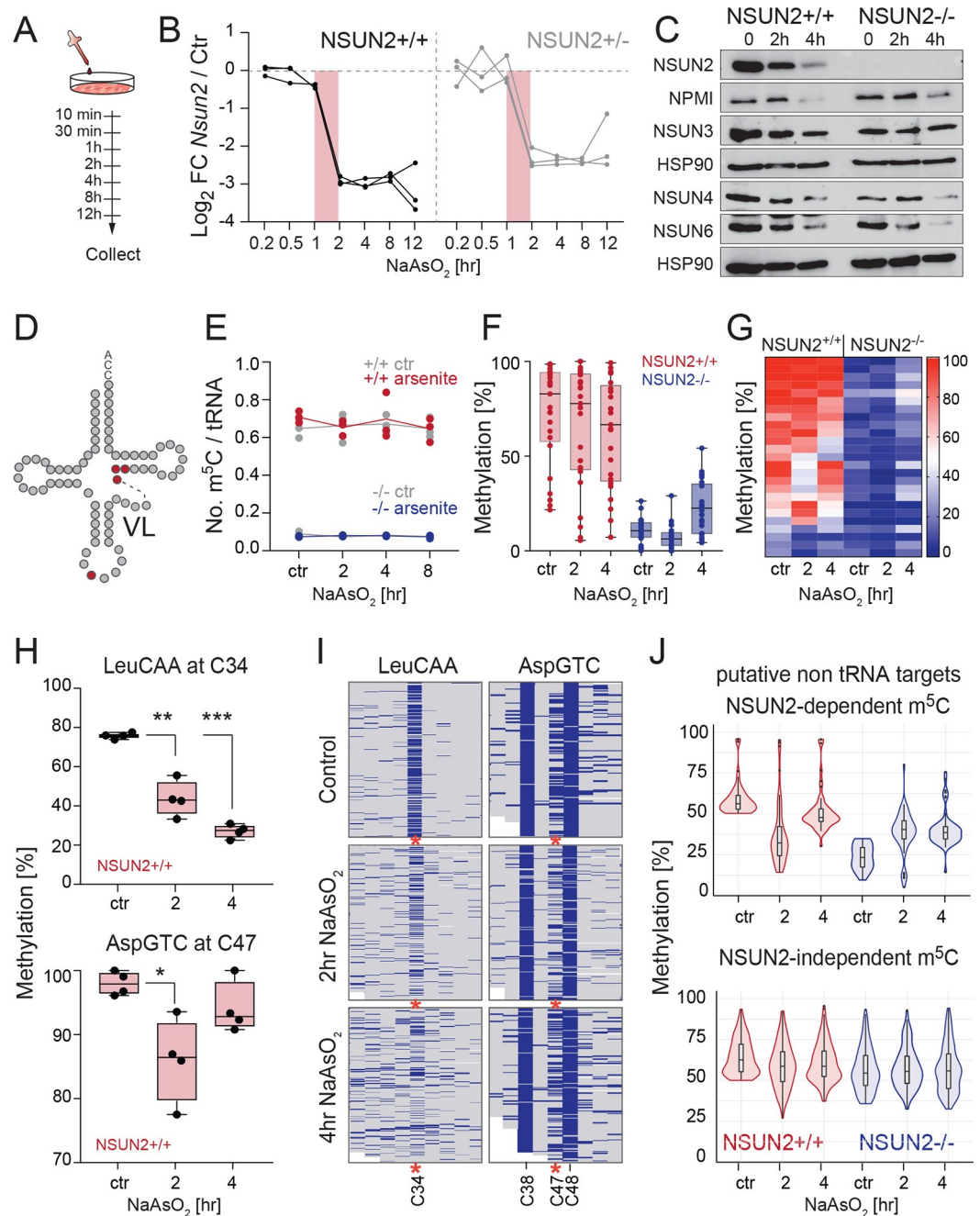
## Stress induces a site-specific and dynamic loss of m<sup>5</sup>C

We then asked how stress-related loss of NSUN2 altered tRNA methylation (Fig 4D). Indeed, MS quantifying total m<sup>5</sup>C in tRNAs confirmed that cells chronically lacking NSUN2 (*NSUN2* −/−) show low levels of m<sup>5</sup>C (Fig 4E) [11]. However, acute depletion of NSUN2 by oxidative stress exposure resulted in no significant differences in total m<sup>5</sup>C levels in tRNAs (Fig 4E). Because tRNAs are highly abundant and stable and commonly contain m<sup>5</sup>C, we considered the possibility that early site-specific changes might not be detectable by MS. Therefore, we performed RNA BS-seq to quantify m<sup>5</sup>C at single-nucleotide resolution in tRNAs (S4D Fig) [11,40].

RNA BS-seq revealed only a modest overall reduction of cytosine-5 tRNA methylation at NSUN2-dependent sites in two independent experiments (Fig 4F; S4E Fig; S8A and S8B Data). NSUN2-independent methylated sites were unaffected (S4F Fig). Furthermore, our data allowed a high-resolution inspection of specific sites that require NSUN2 activity, which showed dynamic and reproducible changes in response to stress (Fig 4G–4I; S4G–S4I Fig). For example, methylation at C34 in Leu<sup>CAA</sup> decreased gradually with arsenite treatment (Fig 4H and 4I; S4H Fig). Methylation of Asp<sup>GTC</sup> at position C47 only significantly changed at 2 hours of arsenite treatment, whereas nearby sites (C38, C48) remained unchanged (Fig 4H and 4I; S4I Fig). We observed a similar change in methylation levels when we pooled all other potentially non-tRNA targeted sites by NSUN2, whereas other m<sup>5</sup>C sites were unaffected by stress (Fig 4J; S9A and S9B Data). Together, our data revealed that NSUN2-mediated deposition of m<sup>5</sup>C at distinct sites in tRNAs changed dynamically in response to oxidative stress.

## Dynamic changes of site-specific m<sup>5</sup>C levels require NSUN2

Next, we asked whether NSUN2 was solely responsible for causing the site-specific methylation changes in tRNAs in response to oxidative stress. We rescued *NSUN2*−/− cells with NSUN2, K190M, or the empty vector as a control and performed RNA BS-seq. We selected for all sites with a minimum coverage of 100 and more than 5% methylation in the pooled replicates (*n* = 5) of untreated NSUN2-overexpressing cells (approximately 7,400 sites) (S10 Data). Reexpression of NSUN2 significantly restored 525 methylation sites when compared to the empty vector control (Fig 5A) and 431 sites when compared to K190M-overexpressing cells



**Fig 4. Levels of m<sup>5</sup>C changes site-specifically and dynamically in response to oxidative stress.** (A) Time course of sodium arsenite treatment. (B) Log<sub>2</sub> FC of *Nsun2* RNA expression in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>+/-</sup> cells relative to GAPDH and normalised to the untreated control (Ctr). Shown are 3 replicates. (C) Western blot analysis of the indicated proteins using whole cell lysates from *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells. Hsp90 served as a loading control. (D,E) Detection of m<sup>5</sup>C in sodium arsenite-treated and untreated (ctr) *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *-/-* cells using mass spectrometry. (*n* = 3 samples per time point). (F) Quantification of tRNA methylation percentage using RNA bisulfite sequencing of *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells (*n* = 4 samples per time point). (G) Heatmap of methylation status of individual tRNA molecules shown in (F). (H, I) Quantification (H) and heatmap (I) of methylation changes in the tRNAs Leu<sup>CAA</sup> and Asp<sup>GTC</sup> in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells. (J) Quantification of methylation in non-tRNA targets. Data represent median in F, H, and J. Error bars are ±SD. *p*-Values: Student's *t* test, \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01. \*\*\**p* < 0.001. The underlying data for this figure can be found in S8 and S9 Data and S1 File. FC, fold-change; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HSP90, heat shock protein 90; m<sup>5</sup>C, 5-methylcytosine; NPM1, nucleophosmin; tRNA, transfer RNA; VL, variable loop.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297.g004>

(Fig 5B). Reexpression of NSUN2 restored the level of tRNA methylation similarly to endogenous NSUN2 (S5A Fig).

We confirmed that the overexpressed proteins behaved like endogenous NSUN2 and were down-regulated upon exposure to arsenite (S5B Fig), and then we assessed how global methylation levels changed. We selected all significant sites with more than 20% methylation in the NSUN2-rescued cells when compared to K190M-infected cells and found that the overall median methylation levels remained largely unaltered (Fig 5C). MS for m<sup>5</sup>C using all tRNAs or tRNA Leu<sup>CAA</sup> confirmed similar methylation levels after exposure stress (Fig 5D and 5E). Thus, global methylation levels in NSUN2<sup>-/-</sup> rescued cells remained largely stable in response to stress.

Then, we identified all individual m<sup>5</sup>C sites showing significantly different methylation levels in NSUN2-rescued cells after 2 or 4 hours of stress (Fig 5F). A majority of these specific sites required NSUN2 (Fig 5F), and their changes in methylation were highly comparable to cells expressing endogenous NSUN2 (NSUN2<sup>+/+</sup>; Fig 4G–4I). For instance, C34 in the anticodon loop of tRNA Leu<sup>CAA</sup> exhibited up to 4-fold reduction of methylation (Fig 5G and 5H). Levels of m<sup>5</sup>C located to other positions showed a more modest reduction or were unaltered (Fig 5I–5L). Thus, we identified specific m<sup>5</sup>C sites that recapitulated the same changes in methylation when exposed to stress as described for NSUN2<sup>+/+</sup> cells. Our rescue experiment therefore demonstrates that distinct m<sup>5</sup>C sites in tRNAs changed dynamically in response to stress and that these changes in methylation levels directly depended on NSUN2.

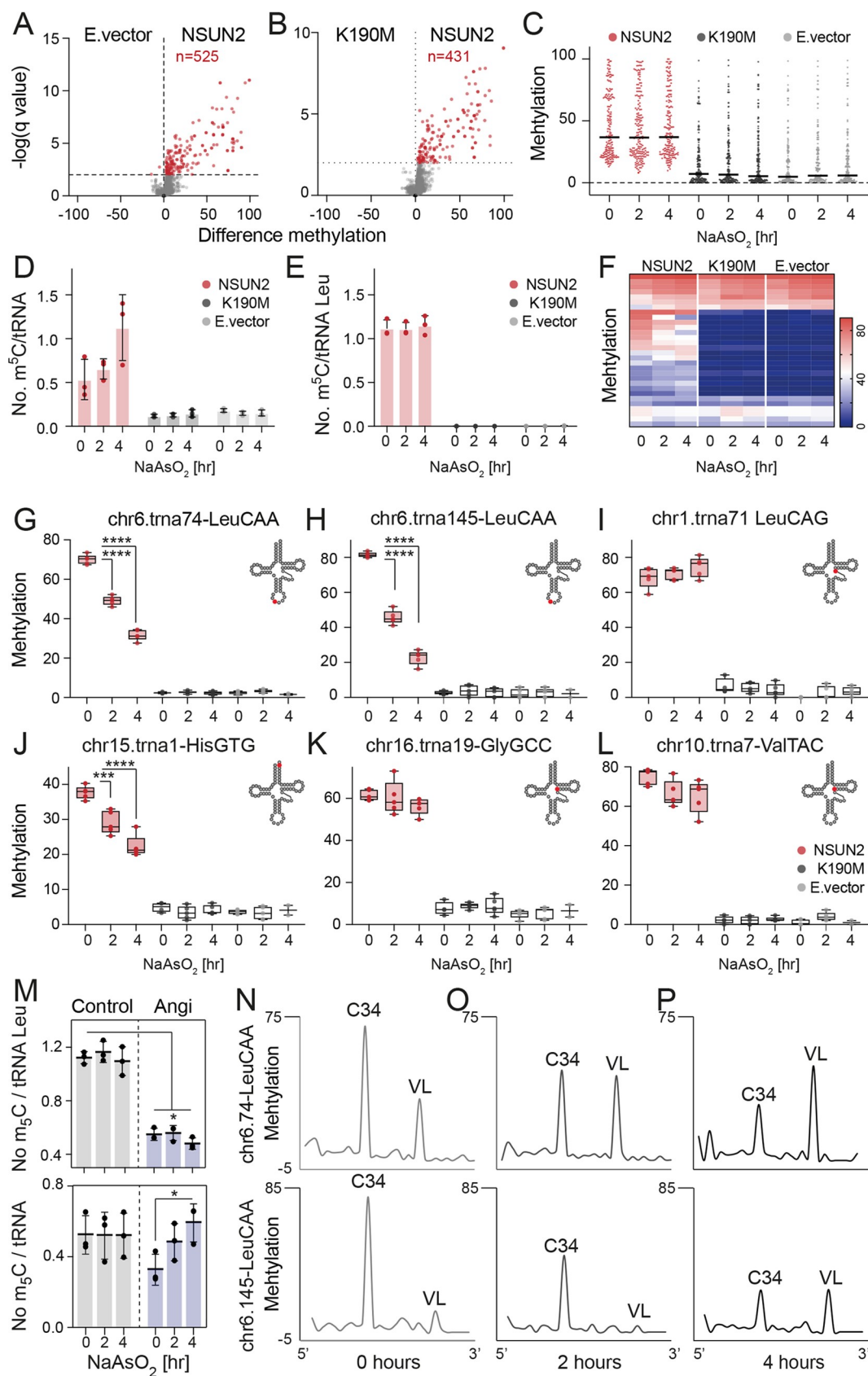
### Methylation levels within the same tRNA molecule are independent from each other

To explain why the site-specific methylation levels were not detected by MS, we first considered the possibility that unmethylated tRNAs escaped the MS analysis because of the long half-life of methylated tRNAs and the enhanced biogenesis of tRFs in response to stress. To test this hypothesis, we measured m<sup>5</sup>C in stress-exposed tRNAs in the presence of an angiogenin inhibitor (N65828) [41]. Indeed, we measured a reduction of m<sup>5</sup>C in all tRNAs and more than 2-fold reduction in tRNA Leu<sup>CAA</sup> (Fig 5M), confirming that angiogenin was a major endonuclease cleaving unmethylated tRNAs (S5C Fig). However, the number of m<sup>5</sup>C per tRNA Leu<sup>CAA</sup> decreased only slightly after 4 hours of stress (Fig 5M; upper panel). tRNA Leu<sup>CAA</sup> contained two methylation sites, one in the anticodon C34 and one in the VL (Fig 5N–5P), and these sites were affected differently by oxidative stress. Only C34 decreased upon stress (Fig 5N–5P). We observed a similar dynamic change of methylation patterns within tRNA His<sup>GTG</sup> (S5E Fig). Moreover, other leucine isotype tRNAs such as Leu<sup>CAG</sup> were not methylated at C34 (S5D Fig). Thus, our data revealed that site-specific methylation of tRNAs changes dynamically during the cellular stress response even within the same tRNA molecule.

### Site-specific tRNA methylation determines tRFs biogenesis in response to oxidative stress

Next, we asked how altered expression of NSUN2 during the cellular stress response affected the biogenesis of tRFs. We performed small RNA-seq to identify all tRNA-derived sequences that significantly (*p*<sub>adj</sub> < 0.01) changed in NSUN2<sup>-/-</sup> cells after exposure to sodium arsenite for 2 hours (S11A and S11B Data). As expected, most tRNA-derived sequences started from the first tRNA nucleotide. Furthermore, we observed an enrichment of fragments starting at around positions 20 and 36, corresponding to the D-loop and the anticodon loop, respectively [42,43] (Fig 6A). Because some RNA modifications can stall reverse transcription (RT) and potentially cause sequencing biases, we only analysed tRNA-derived sequences with consistent





**Fig 5. NSUN2-mediated tRNA methylation is dynamic and site-specific.** (A, B) Volcano plot depicting the significant methylation changes when NSUN2 was reexpressed in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells compared to empty ('E.') vector (A) or K190M controls (B). (C) Global methylation levels of all m<sup>5</sup>C sites identified in (B) after treatment with arsenite for 0, 2, or 4 hours. Shown are all sites >20% methylation in NSUN2-rescued cells. (D, E) Mass spectrometry analyses to quantify the number of methylated sites (m<sup>5</sup>C) in all tRNA (D) or only tRNA Leu<sup>CAA</sup> (E) in response to stress. (F) Heatmap showing all significantly different m<sup>5</sup>C sites ( $p < 0.05$ ) changing upon stress in NSUN2-overexpressing cells. (G-L) Examples of m<sup>5</sup>C sites identified in (F). \* $p_{adj} < 0.05$ ; \*\* $p_{adj} < 0.01$ ; \*\*\*\* $p_{adj} < 0.0001$  (ordinary one-way ANOVA, multiple comparisons). (M) Mass spectrometry analyses to quantify m<sup>5</sup>C in tRNA leucine (upper panel) and all tRNAs (lower panel) in the presence of an angiogenesis inhibitor ('Angi') and arsenite. Data presented as mean ( $n = 3$ ), error bars  $\pm$  SD.  $p$ -Value:  $p_{adj}$  ANOVA. (N-P) Methylation levels (pooled from 5 replicates) of cytosines along tRNA 74-Leu CAA (upper panels) and 145-Leu CAA (lower panels) detecting all m<sup>5</sup>C sites within the tRNA molecule with different dynamic changes in response to stress. The underlying data for this figure can be found in [S10 Data](#) and [S1 File](#). m<sup>5</sup>C, 5-methylcytosine; tRNA, transfer RNA; VL, variable loop.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297.g005>

coverage in all four replicates and omitted all fragments with missing read values in any of the conditions from the analyses ([S11C Data](#)).

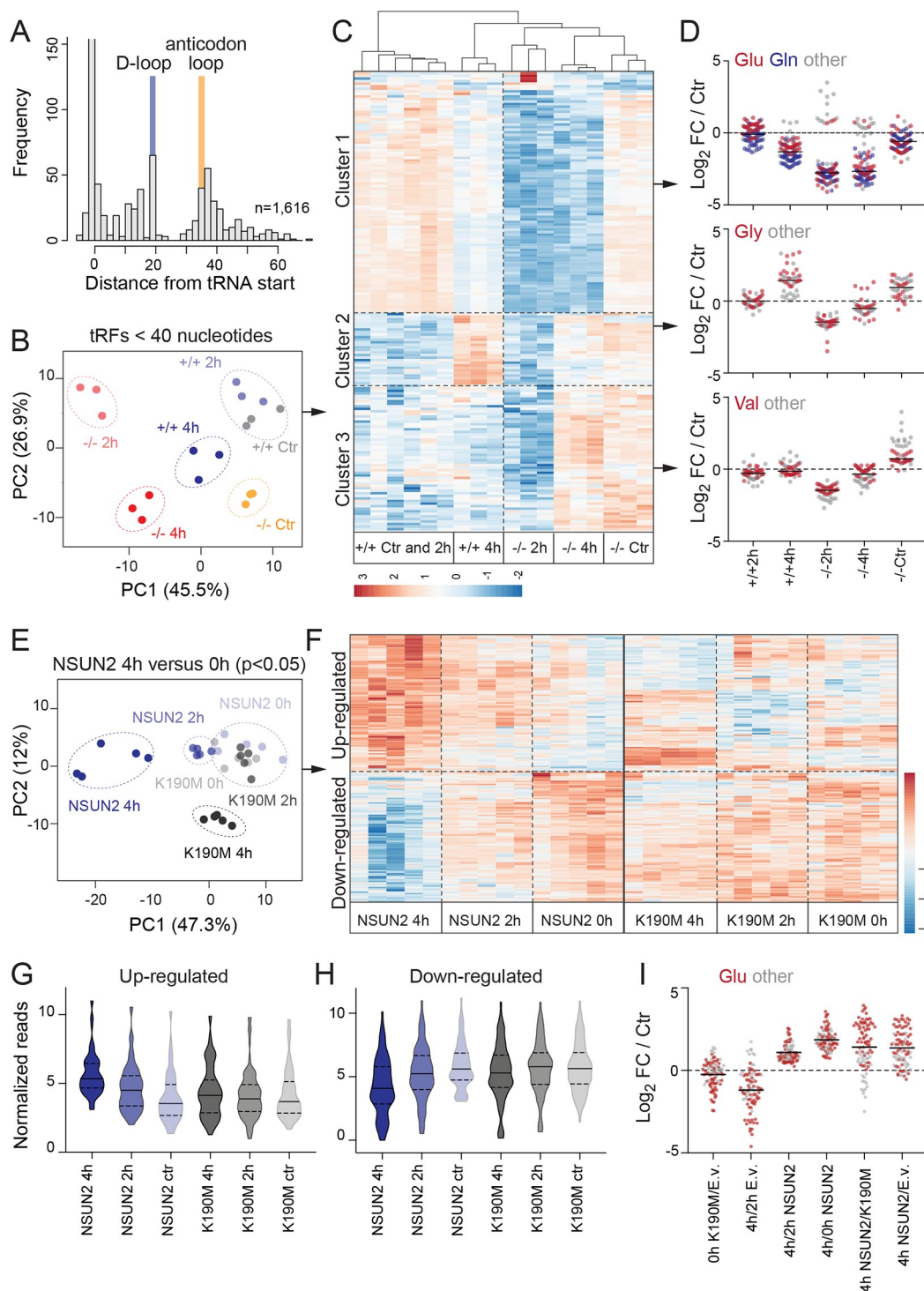
Next, we focused specifically on tRFs that were smaller than 40 nucleotides, which capture the products of endonucleolytic cleavage ([S11D Data](#)). Principal component analysis (PCA) confirmed a clear separation by both genotype and treatment ([Fig 6B](#)), and tRFs from *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells clustered closer to *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells exposed to stress for 4 hours ([Fig 6B](#)). Furthermore, tRFs clearly separated the 2- and 4-hours-treated *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells from their untreated control. In contrast, *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells only showed distinct changes in tRFs when exposed for 4 hours to arsenite ([Fig 6B](#)). When subjected to stress, we discovered three distinct patterns of tRF production ([Fig 6C](#); Cluster 1–3). Each cluster was dominated by distinct tRNA isoacceptors ([Fig 6D](#)), indicating that tRNAs were subjected to processing based on their sequence and potentially other corresponding internal modifications. Our data support a model in which all cells produce tRFs but the tRNA fragmentation pattern depends on the identity of the isoacceptor and the presence of modifications at distinct sites within the tRNA molecule.

In line with the reduction of NSUN2 protein expression in response to stress, tRFs derived from NSUN2-methylated tRNAs significantly increased after 4 hours of stress ([S6A–S6C Fig](#); red and [S5C Fig](#)). The same tRFs remained unchanged or decreased in NSUN2-depleted cells ([S6A–S6C Fig](#); blue and [S5C Fig](#)). In conclusion, the production of tRFs in response to stress differed substantially in the absence of NSUN2, confirming that tRF biogenesis was influenced by tRNA methylation, isoacceptor identity, and cellular stress.

### Biogenesis of tRF subsets is directly determined by tRNA methylation

To identify tRFs whose biogenesis directly required the enzymatic activity of NSUN2, we performed small RNA-seq analyses in the rescued *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells that were either untreated or exposed to sodium arsenite. We identified all tRFs with differential abundance in NSUN2-rescued cells after 4 hours of stress ([Fig 6E](#); [S12 Data](#)). Untreated NSUN2-rescued cells clustered close to K190M-overexpressing cells ([Fig 6E](#)), which was due to a distinct set of up-regulated and down-regulated tRFs ([Fig 6F](#); 'NSUN2 4h'). The production of these tRFs required NSUN2-mediated methylation because they remained unchanged in K190M-overexpressing cells ([Fig 6G and 6H](#)). As described for cells expressing endogenous levels of NSUN2 (*NSUN2*<sup>+/+</sup>), the up- and down-regulated groups of tRFs were dominated by specific tRNA isoacceptors ([Fig 6I](#); [S6D Fig](#)). We concluded that NSUN2-mediated methylation at distinct sites within the tRNA molecule protected from processing into tRFs and thereby promoted efficient mRNA translation.

In particular, the formation of tRNA Glu<sup>CTC</sup>-derived tRFs depended on NSUN2 ([Fig 6I](#)). tRFs inhibit protein synthesis via several mechanisms including through direct inhibition of the ribosome or displacement of RNA-binding proteins [[13,44,45](#)]. To demonstrate that tRFs



**Fig 6. Site-specific tRNA methylation determines biogenesis of distinct tRFs.** (A) Density plot of tRNA-derived sequences beginning at the indicated positions. (B) Clustering of tRNA-derived fragments < 40 nucleotides in *NSUN2* +/+ and *NSUN2* -/- cells untreated (‘Ctr’) or treated with sodium arsenite for 2 or 4 hours. Shown are 3 out of 4 replicates per time point. (C, D) Heatmap (C) and log<sub>2</sub> FC of tRFs shown in (C). (E, F) PCAs (E) and heatmap (F) of significantly different tRFs in *NSUN2* -/- cells rescued with a wild-type (*NSUN2*) or point mutated (*K190M*) *NSUN2* construct after 4 hours of exposure to stress compared to the untreated control (‘0h’). (G, H) Violin plots showing the read distribution of the tRFs shown in (E, F). (I) Log<sub>2</sub> FC of the up-regulated tRFs when *NSUN2*-overexpressing cells are exposed to stress for 4 hours. tRNA glutamic acid-derived tRFs are highlighted in red. Line indicates the mean. The underlying data for this figure can be found in [S11](#) and [S12](#) Data and [S1 File](#). FC, fold-change; PCA, principle component analysis; tRF, tRNA-derived fragment; tRNA, transfer RNA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297.g006>



directly link stress sensing by NSUN2 to repression of protein synthesis, we independently added synthetic 5' and 3' tRNA Glu<sup>CTC</sup> fragments to *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *-/-* cells and measured protein synthesis (S6E–S6H Fig). A scrambled noncoding RNA served as a negative control. Within 2 hours, 5' and 3' derived tRFs reduced protein synthesis in *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells (S6F Fig). Similar to the stress response, the protein synthesis rate was only temporarily repressed (S6F Fig). In contrast, protein synthesis in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells was unaffected by the introduction of additional tRFs, since *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells are already saturated (S6G Fig; S6C Fig; S5C Fig). We confirmed that the transfection efficiency was comparable in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *-/-* cells (S6H Fig). Thus, our data demonstrate that the intrinsic formation of tRFs is sufficient to dynamically regulate protein synthesis.

### m<sup>5</sup>C is required to balance anabolic and catabolic pathways during the stress response

To better understand how the failure to adapt protein synthesis rates to the external stress stimulus affected metabolic pathways, we identified all differentially expressed genes in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells after exposure to sodium arsenite (Fig 7A; S13A–S13C Data). A total of 2,799 genes were differentially expressed in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells when compared with *NSUN2*<sup>+/+</sup> cells in all conditions and thus not influenced by the stress signal. We identified 884 and 1,584 mis-regulated genes in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells after 2 and 4 hours of stress, respectively (Fig 7A).

Two hours after stress exposure, regulators controlling mitochondrial function were significantly enriched in the differentially expressed genes (Fig 7B; S14A Data). In particular, genes encoding for complex I subunit assembly significantly changed in the absence of NSUN2. Complex I is the major entry point for electrons into the respiratory chain and likely to act as the rate-limiting step in respiration [46]. In line with these results, we confirmed that *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells contained less-active mitochondria in particular during the early stress response (S7A and S7B Fig).

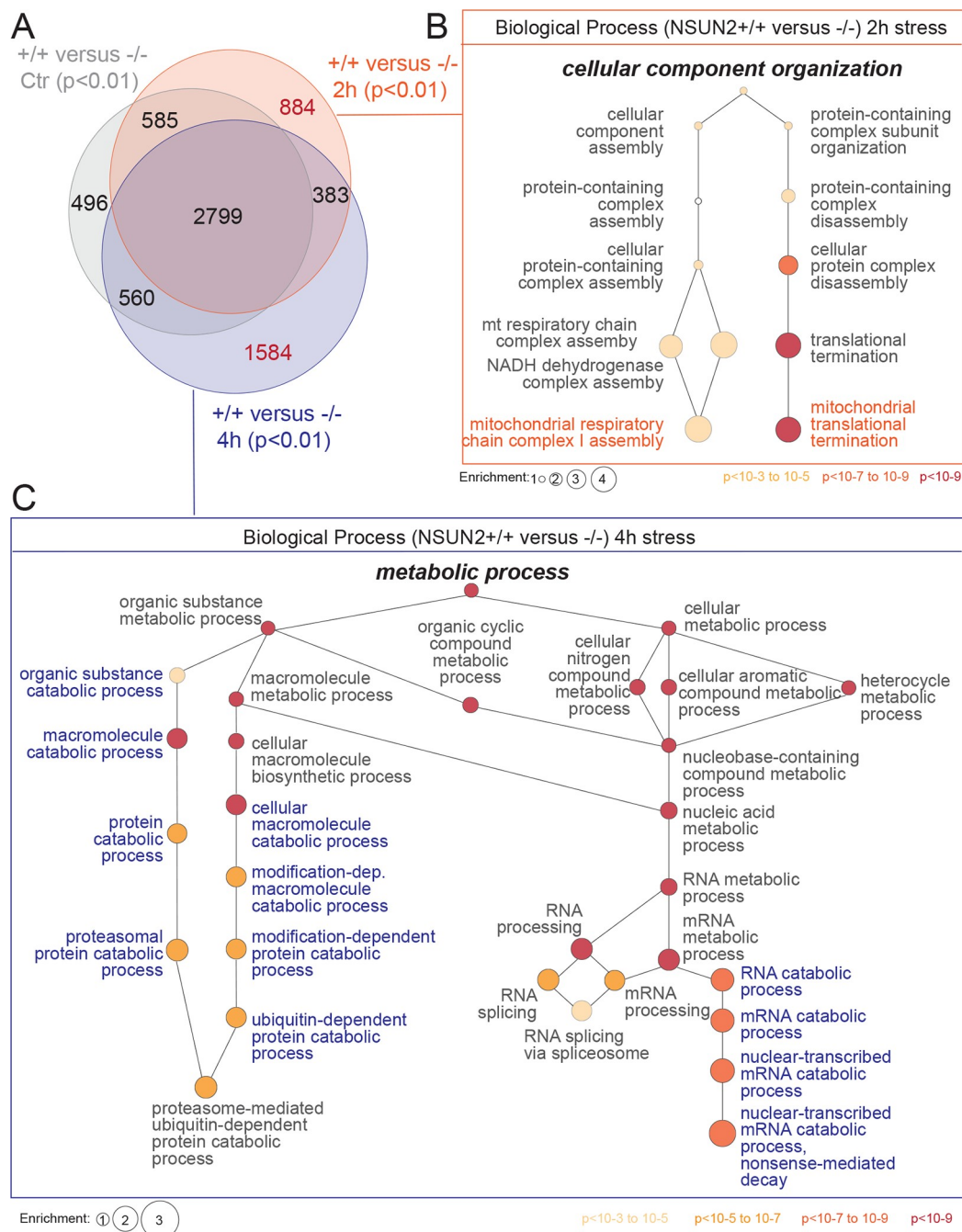
Four hours after stress exposure, the differentially expressed genes were significantly enriched in regulators of RNA and protein catabolic pathways (Fig 7C; S14B Data). These results closely parallel those of our metabolic assay that showed how loss of m<sup>5</sup>C captures cells in a catabolic state and affected mitochondrial function (Fig 1).

Finally, we asked whether factors promoting the stable catabolic state in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells were translationally regulated and could therefore be identified using ribosome profiling (Ribo seq). We used our previous published dataset (phs000645.v5.p1), in which we profiled *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells that were rescued with NSUN2 or two different enzymatic dead versions of the protein (C271A, C321A) and compared them to the empty vector control cells (S15 Data) [12]. We confirmed that genes specifically enriched in the NSUN2-rescued cells were regulators of mRNA translation and RNA catabolic processes (S7C–S7E Fig). We now have further demonstrated that the formation of m<sup>5</sup>C balances protein synthesis with the metabolic requirements of stress responses.

In summary, our data revealed a highly dynamic regulation of protein synthesis rates in response to stress that is tightly coordinated by tRNA methylation and cleavage. We further discovered that loss of a major RNA methyltransferase shaped the biogenesis of tRNA fragments and thereby induced a catabolic cell state.

### Discussion

mRNA translation is a critical step for all gene expression programmes and also represents the most energy-consuming processes within cells [47]. Therefore, global and transcript-specific translation are continuously adapted to environmental cues including nutrients, growth factors, and stress stimuli. How precisely the external cues are sensed by the mRNA translation



**Fig 7. Loss of NSUN2 alters mitochondrial function and catabolic pathways in response to stress.** (A) Venn diagram showing all significantly expressed genes in NSUN2 $-/-$  cells compared to NSUN2 $+/+$  when untreated ('Ctr') or treated for 2 and 4 hours with sodium arsenite. (B, C) Gene enrichment analysis for biological processes (GORilla) using the 884 uniquely changed genes in NSUN2 $-/-$  cells after 2 hours (B) or the 1,584 uniquely changed genes after 4 hours (C) of stress exposure. Colour code indicates  $p$ -value, and size reflects enrichment. The underlying data for this figure can be found in S13 and S14 Data.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000297.g007>

machinery, integrated into metabolic pathways, and then coordinated to trigger the appropriate cell response is less well understood. Here, we identify NSUN2 as an important sensor for oxidative stress. NSUN2 further links the environmental cue to the protein synthesis

machinery via tRNA methylation. Loss of NSUN2 repressed global protein synthesis and thereby induced a catabolic cell state without affecting gene transcription.

External stress stimuli repress global protein synthesis, causing a switch of translation to stress- and cell type-specific regulatory proteins [48]. tRNAs play multiple regulatory roles in the adaptation of protein synthesis to the cellular stress response. For instance, the content of internal tRNA modifications and also the level of charged tRNAs rapidly changes in response to stress [49]. Loss of tRNA methylation at the VL causes global reduction of protein synthesis [11,12]. Changing the modifications at the wobble anticodon position alters transcript-specific translation [50–52].

Mature mammalian tRNAs are extremely stable, with an estimated half-life of 2–4 days [49,53], making the detection of dynamically changing m<sup>5</sup>C sites within hours of a stress response challenging. Nevertheless, we detected site-specific changes by RNA BS-seq. How m<sup>5</sup>C was site-specifically removed in distinct tRNAs is unknown, as no eraser protein has been identified so far. Alternatively, unmodified tRNAs might have a higher turnover and are therefore more difficult to capture than fully modified tRNAs.

Nucleotide modifications outside the anticodon loop are often linked to differential processing and cleavage of tRNAs [10,11,54,55]. Accordingly, NSUN2-expressing and -lacking cell populations differed in their production of tRFs under normal conditions and when exposed to cell stress. Depending on NSUN2-expression and stress, we observed distinct tRNA processing patterns. For instance, tRFs derived from tRNA Glu<sup>CTC</sup> were specifically enriched in NSUN2-depleted cells and decreased in abundance with stress. Similarly, synthetic tRNA Glu<sup>CTC</sup> fragments efficiently repressed protein synthesis, yet the effect was only short-lived. How the half-life of tRFs is regulated is currently unknown, but our data strongly indicate a dynamic turnover of the tRFs in response to stress. A high turnover of distinct tRFs can also explain the only temporal repression of global protein synthesis after stress exposure.

In summary, NSUN2-mediated formation of m<sup>5</sup>C is critical for integrating the cellular metabolic state with global protein synthesis and thereby triggers the appropriate cellular responses to external stress stimuli.

## Methods

### Ethics statement

The research including mice has been regulated under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations 2012 following ethical review and approval by the University of Cambridge Animal Welfare and Ethical Review Body (AWERB) under the terms of the United Kingdom Home Office licences PPL80/2231, PPL80/2619 and PPL\_P36B3A804.

### Transgenic mice

The NSUN2 knockout mice (homozygous *Nsun2*<sup>Gt[D014D11]W<sup>rst</sup></sup>) were generated and genotyped as previously described [18].

### Cell sorting and analysis

Mouse keratinocytes from skin in telogen at postnatal day (P)49 of wild-type or NSUN2<sup>-/-</sup> male mice were isolated as follows: whole mouse back skin was sterilised with 10% Betadine and 70% ethanol and washed in phosphate-buffered saline (PBS). The dermal side was floated on 0.25% trypsin without EDTA (Thermo Fisher Scientific) for 2 hours at 37°C. The epidermis was subsequently scraped from the dermis and disaggregated by gentle pipetting in low-calcium medium with 10% FCS and filtered through a 70 µm cell strainer. The cells were pelleted

and resuspended in the following antibodies to cell surface markers in 2% bovine serum albumin (BSA): PE-conjugated anti-ITGA6 (1:500, clone GoH3, eBiosciences), Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD34 (1:50, RAM34, eBiosciences), and goat anti-PCAD (1:50, R&D Systems). After incubation for 30 minutes at 4°C, cells were washed twice in PBS. For detection of PCAD, cells were incubated for 10 minutes at 4°C with anti-goat Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:500, Thermo Fisher Scientific). Cells were gated using forward versus side scatter to eliminate debris. Doublet discrimination was carried out using pulse width. The viable cells were then gated by their exclusion of sytox. Cells were sorted with a MoFlo high-speed sorter (Beckman Coulter) as follows: ITGA6<sup>high</sup>/CD34+ as hair follicle BG stem cells and ITGA6<sup>low</sup>/P-CAD<sup>high</sup> as HG progenitor cells.

### Amplification of RNA from flow-sorted cells

Whole back skin of wild-type or NSUN2<sup>-/-</sup> male mice at P49 was collected as skin in telogen and at P32–34 as skin in anagen. Hair follicle stages in telogen and anagen were verified by HE staining for each skin biopsy. RNA from flow-sorted cells was purified using Pure-Link RNA Micro Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific). RNA was purified from 10<sup>5</sup> to 3 × 10<sup>5</sup> ITGA6<sup>high</sup>/CD34+ per biological replicate and 10<sup>4</sup> to 5 × 10<sup>4</sup> ITGA6<sup>low</sup>/PCAD<sup>high</sup> per biological replicate. For each biological replicate, flow-sorted cells from 1 to 3 mice were pooled. Total RNA (75 pg; with an RIN of 8 or above) were amplified using an adapted version of the Kurimoto protocol [56]. The main changes to their published protocol included the use of an increased amount of Superscript III, primers, and dNTPs as well as a longer RT reaction. Samples were amplified for a total of 29 cycles, and each sample was split into 4 during this amplification process and combined at the end to avoid errors introduced by PCR being overrepresented in the final library. Low-DNA/RNA bind tips and tubes were used throughout the experiment.

### Gene expression arrays and analyses

RNA samples were amplified using the Genechip WT Plus kit (Thermo Fisher Scientific). Briefly, the RNA was converted into cDNA and amplified using a mix of primers to target polyA and non-polyA mRNAs generating biotin-labelled cRNA. The cRNA was then hybridised to the Gene ST array, stained, and scanned using the GeneTitan Instrument (Thermo Fisher Scientific). After purification, quality control, and quantity normalisation, the cRNAs of four samples per genotype and condition were hybridised to the Affymetrix MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip (Illumina). Hybridisation, washing, staining, and scanning were performed according to standard Illumina protocols (Illumina Whole-Genome Gene Expression DirectHyb Assay). Microarray hybridisation, washing, and scanning were performed at the Cambridge Genomic Services at the Department of Pathology (University of Cambridge, Cambridge, UK). Differential expression analysis was done with the R limma package using default settings.

### In situ hybridisation via RNAscope

*Nsun2* RNA in mouse skin was labelled using the RNAscope in situ hybridisation technology [57]. Freshly cut paraffin-embedded tissue sections were first heated at 56°C for 1 hour, dewaxed, and dehydrated. Endogenous peroxidases were blocked, followed by target retrieval steps (antigen retrieval and protease digestion). The *Nsun2* probe (Cat.426721) was hybridised for 2 hours at 40°C, followed by the six-step amplification protocol. The signal was developed with DAB, and slides were counterstained with 6% Mayer's Haematoxylin, further dehydrated, cleared in Xylene, and mounted in DPX.

## Cell lines and culture conditions

*NSUN2*<sup>+/+</sup> human dermal fibroblasts were purchased from Invitrogen (C0135C; Thermo Fisher). *NSUN2*<sup>+/-</sup> and two lines of *NSUN2*<sup>-/-</sup> human dermal fibroblasts were established as previously described [7]. All cells were cultured in Minimum Essential Medium (MEM, 31095–052; Thermo Fisher) supplemented with 20% HyClone FBS (SV30180.03; GE Healthcare) and 1% Penicillin-Streptomycin (P0781; Sigma-Aldrich). For the rescue experiments, *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells were stably infected with the wild-type or an enzymatic dead version of *NSUN2* carrying a single point mutation (K190M) [30]. Empty vector (pBABE)–infected cells served as a control. All *NSUN2*<sup>-/-</sup> rescue cells were cultured in MEM (31095–052; Thermo Fisher) supplemented with 20% HyClone FBS (SV30180.03; GE Healthcare) and no antibiotics.

Cells were passaged using Trypsin-EDTA (0.25%, 25200072; Thermo Fisher) diluted in PBS to a 1:1 ratio and split as required. Cells were maintained at 37°C in a humidified incubator with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were grown on plastic dishes or flasks of tissue culture grade, depending on the experiment (Falcon; Corning and Nunc; Thermo Fisher).

To induce oxidative stress, cells at 80% confluency were incubated with fresh prewarmed media containing 200 μM sodium arsenite (stock solution 200 mM in PBS; NaAsO<sub>2</sub>, Sodium [meta]arsenite, S7400; Sigma-Aldrich) for the indicated time. To induce UV radiation stress, cells at 80%–90% confluency without medium were exposed to 100 J/m<sup>2</sup> of UV light in a CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP). Fresh media were added directly after the exposure. To label the active mitochondria, the MitoTracker Red CMXRos reagent was used (M7512; Invitrogen) following the manual's recommendations. Cells were incubated with 200 mM MitoTracker reagent (in DMSO) dissolved in cell culture medium for 30 minutes. To inhibit the mTOR pathway, rapamycin was used at a 500 nM or 1 μM concentration diluted in cell culture medium (stock solution: 2.74 mM in DMSO, R8781; Sigma-Aldrich). To inhibit angiogenin, cells were exposed to 43 μM of the small-molecule inhibitor N65828 (8-amino-5-[40-hydroxy-biphenyl-4-yl azo] naphthalene-2-sulphonate) obtained from the National Cancer Institute (<http://dtp.cancer.gov>) (stock aliquots of 1 mg/mL: 1 mg powder in 100 μl DMSO and 900 μl PBS). Cells incubated with 0.5% (v/v) PBS or 0.5% (v/v) DMSO in cell culture medium served as controls.

For transfection with tRNA fragments, cells were grown in 6-well plates and additionally transfected with synthetic 5' and 3' tRNA fragments. For this, 10 μM of tRNA fragments were mixed with antibiotic-free medium and the DharmaFECT1 Transfection Reagent, by following manufacturer's recommendations (T-2001, Dharmacon; GE Healthcare). The tRNA fragments used were 5'-Glu-CTC tRNA-F synthetic sense (5' UCC CUG GUG GUC UAG UGG UUA GGA UUC GGC GCU CUC) and 3'-Glu-CTC-tRNA-F synthetic sense (5' CCG CCG CGG CCC GGG UUC GAU UCC CGG UCA GGG AA) (Thermo Fisher). Mock control samples with just the transfection reagent and 10 μM of fluorescently labelled control siRNA (Qia-gen) served as negative controls. Samples were collected in a time course for up to 24 hours posttransfection.

## Metabolic analysis

For LC-MS/MS, *NSUN2*<sup>+/+</sup>, *NSUN2*<sup>+/-</sup>, and two biological replicates of *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells were cultured in 150 mm round dishes and in five technical replicates each. In total, 8 to 10 million cells were collected per sample, pelleted, and flash-frozen in liquid nitrogen until further analysis. In addition, back skin from *NSUN2*<sup>-/-</sup> was collected from P26–P27 male mice in anagen. A total of 5 wild-type and 3 *NSUN2*<sup>-/-</sup> mice were used. Fat and connective tissue was scraped off, and the skin samples were snap frozen in liquid nitrogen. Each sample (70



mg) was homogenised on ice in methanol/chloroform using a tissue homogeniser (Polytron PT2500, Kinematica). To assess the metabolic content of these samples, LC-MS/MS was performed and optimised with internal standards, for the targeted analysis of aqueous metabolites including methionine and TCA cycle intermediates, nucleotides, and amino acids [58,59]. For NMR spectroscopy, skin samples from 4 wild-type and 3 NSUN2<sup>-/-</sup> mice were prepared as described before and processed as previously described [60].

### RNA isolation, RT, and RT-qPCR

Total RNA was prepared using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. For further purification, total RNA was subjected to 30 minutes TURBO DNase treatment (AM2239; Invitrogen) at 37°C following manufacturer's instructions. To inactivate the reaction, the samples were Phenol:Chloroform (77617; Sigma-Aldrich) extracted and precipitated using sodium acetate (pH 5.5) and 1–2 µl Glycoblue (AM9516; Ambion) overnight at –80°C. The RNA was washed with ethanol and resuspended. The concentration of each sample was assessed using a Qubit Fluorometer and the Qubit RNA HS Assay Kit (Q32855; Invitrogen) following the kit's instructions.

Double-stranded cDNA was synthesised from 1 µg of RNA and the Superscript III reverse transcriptase (18080085; Life Technologies) following manufacturer's instructions using Random Primers (C1181; Promega). Each RT quantitative PCR (RT-qPCR) reaction was set up in MicroAmp Optical 96-well plates (N8010560) using 1 µl cDNA, 5 µl TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (4366073), 3.5 µl RNase-free water, and 0.5 µl of a predesigned *Nsun2* probe (Hs00214829\_m1; Applied Biosystems). A human GAPDH probe was used for normalisation using the ΔCt method (4333764T; Applied Biosystems). RT-qPCR and data acquisition were conducted using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

### Protein extraction and western blotting

Cells were first rinsed with PBS and lysed in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCL [pH 7.4], 1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate–1 mL RIPA per T75 or 100 mm culture dish). RIPA was supplemented with cComplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablets (11836170001, Roche), and cells were collected using a cell scraper. The lysates were centrifuged for 15 minutes at maximum speed in a precooled centrifuge at 4°C and their supernatant collected and kept on ice. The concentration of each protein sample was assessed using the Pierce BCA Protein Assay kit (23225; Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions and measured using a spectrophotometer and the Softmax software for protein quantification.

Cell protein lysates were mixed with NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (NP0007; Invitrogen) and run on 7.5% or 12.5% separating polyacrylamide gels. PageRuler Prestained Protein Ladder (26616; Thermo Fisher) was loaded as a size marker. All gels were run in 1x SDS Running Buffer (30 g Tris Base, 144 g Glycine, 10 g SDS, and H<sub>2</sub>O to 1 L; for 10x buffer) at 160V for approximately 1 hour, after which the proteins were transferred to a nitrocellulose or PVDF membrane (GE Healthcare) in 1x Transfer Buffer (30.3 g Tris Base, 144 g Glycine, and H<sub>2</sub>O to 1 L; for 10x buffer) containing 15% (v/v) methanol at 90 V, for 1.5 hours on ice. Membranes were blocked for a minimum of 1 hour at room temperature in 5% (w/v) nonfat milk or 5% (w/v) BSA (A4503-50G; Sigma-Aldrich) in 1x TBS and 0.1% Tween-20 (TBS-T) (48.4 g Tris Base, 160 g NaCl, and H<sub>2</sub>O to 1 L; for 20x TBS buffer at adjusted pH 7.6) and incubated with primary antibody in blocking solution overnight at 4°C. Each membrane was washed three times for 10 minutes in TBS-T prior to incubation with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-labelled secondary antibody (1:10,000) in TBS-T at room temperature for 1

hour (anti-mouse NA931 and anti-rabbit IgG HRP NA934; GE Healthcare–anti-goat IgG HRP sc-2020; Santa Cruz). Finally, the membranes were washed as before and the antibodies detected by using the Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232; GE Healthcare). The primary antibodies used were NSUN2 (1:1,000, 20854-1-AP, Proteintech), NSUN3 (1:500, GTX46175, GenTex), NSUN4 (1:500, ab101625, Abcam), NSUN6 (1:500, 17240-1-AP, Proteintech), NPM1 (1:500, B0556, Sigma-Aldrich), and HSP90 (1:500, sc-13119, Santa Cruz).

## Immunofluorescence

Cells were grown directly on autoclaved glass coverslips placed in 12-well culture dishes. Cell culture and sodium arsenite or recombinant angiogenin treatments were carried out as described before. To fix the cells, the glass coverslips were first briefly rinsed with wash buffer comprising 0.1% Tween-20 in 1x PBS and incubated for 10 minutes at room temperature with paraformaldehyde (4% PFA in PBS; Santa Cruz). Cells were then washed three times with ice-cold wash buffer for a couple of minutes. To examine intracellular proteins, cells were permeabilised for 10 minutes with PBS containing 0.25% Triton X-100 at room temperature and washed again three times for 5 minutes in wash buffer. This step was omitted for the study of membrane proteins. To block nonspecific antibody binding, cells were incubated with blocking buffer comprising 1% BSA and 22.52 mg/mL glycine in PBS with 0.1% Tween-20 (PBST) for 1 hour. To detect specific proteins of interest, cells were then incubated with primary antibodies diluted in 1% BSA in PBST at 4°C overnight. The cells were then washed three times in wash buffer for 5 minutes each. To label the detected proteins, cells were incubated with the respective Alexa Fluor secondary antibodies diluted in 1% BSA in PBST for 1 hour at room temperature on a shaker and protected from light (1:1,000; Life Technologies). Cells were washed as before and their nuclei counterstained with DAPI (1:3,000 in PBS; Sigma) for 5 minutes. Finally, cells were rinsed with wash buffer and the glass coverslips mounted on slides with PBS:glycerol solution (1:1). The primary antibodies used were Angiogenin (1:500, PC317L, Calbiochem), eIF4A1 (1:200, sc-14211, Santa Cruz), and p-eIF2α (1:1,000, 9721S, Cell Signaling).

## Detection of m<sup>5</sup>C by MS

Human dermal fibroblasts were grown and treated with sodium arsenite as described above. NSUN2<sup>+/+</sup> and NSUN2<sup>−/−</sup> cells were cultured in 100 mm dishes. Three replicates per condition and genotype were used for the experiments. Cell pellets were collected and lysed directly in Trizol for RNA extraction. To measure the m<sup>5</sup>C modifications, optimised MS analysis was performed [61]. Total RNA was loaded on a size-exclusion column (Agilent Bio SEC-3, 3 μm, 300 Å, 7.8 × 300 mm, Agilent, Waldbronn, Germany) and RNA fractions eluted with 100 mM ammonium acetate at pH 7 as the mobile phase. tRNA was separated from rRNA and small RNAs, vacuum concentrated, and reconstituted in water. tRNA concentrations were determined by UV spectroscopy at 260 nm. rRNA and other large RNA species were excluded from the fractions.

Purified tRNA (approximately 400 ng) was digested using a mixture of benzonase (2 U), bacterial alkaline phosphatase (2 U), and phosphodiesterase I (0.2 U) in a final reaction volume of 20 μL. The reaction mixture was supplemented with MgCl<sub>2</sub> to a final concentration of 1 mM and Tris-HCl (pH 8.0) to a final concentration of 50 mM. Nucleobase deaminase inhibitor coformycin and tetrahydrouridine were added at a final concentration of 10 μg/mL and 50 μg/mL, respectively, and butylated hydroxytoluene (an antioxidant) was added at a final concentration of 0.5 mM (for further detail, see [62]). The digestion was allowed to proceed



for 2 hours at 37°C and was stopped by filtering through a 10 kDa MWCO filter (AcroPrep Advance, 350 µl, Omega 10K MWCO, Pall, Dreieich, Germany) at 3,000g for 30 minutes. After addition of 10 µl pure water for salt dilution purposes, 18 µl of filtrate was mixed with 2 µl of internal standard (produced as recently described [63]). Each sample (10 µl) was injected for LC-MS/MS analysis (corresponding to around 150 ng tRNA digest). Calibration solutions for absolute quantification were prepared as recently described [63].

For quantification, an Agilent 1290 Infinity II equipped with a DAD combined with an Agilent Technologies G6470A Triple Quad system and electro-spray ionisation (ESI-MS, Agilent Jetstream) was used. Operating settings were as follows: positive ion mode, skimmer voltage 15 V, cell accelerator voltage 5 V, N<sub>2</sub> gas temperature 230°C and N<sub>2</sub> gas flow 6 L/minute, sheath gas (N<sub>2</sub>) temperature 400°C with a flow of 12 L/minute, capillary voltage of 2,500 V, nozzle voltage of 0 V, and the nebuliser at 40 psi. The instrument was operated in dynamic MRM mode, and the individual MS parameters for the nucleosides are summarised in [S16 Data](#). The mobile phases were A as 5 mM NH<sub>4</sub>OAc (≥99%, HiPerSolv CHROMANORM, VWR) aqueous buffer, brought to pH 5.6 with glacial acetic acid (≥99%, HiPerSolv CHROMANORM, VWR), and B as pure acetonitrile (Roth, LC-MS grade, purity ≥ 99.95). A Synergi Fusion-RP column (Phenomenex, Torrance, CA, United States; Synergi 2.5 µm Fusion-RP 100 Å, 150 × 2.0 mm) at 35°C and a flow rate of 0.35 ml/minute were used. The gradient began with 100% A for 1 minute and increased to 10% B by 5 minutes and to 40% B by 7 minutes. The column was flushed with 40% B for 1 minute and returned to starting conditions to 100% A by 8.5 minutes followed by re-equilibration at 100% A for 2.5 additional minutes.

For the isolation of single tRNA isoacceptors, a modified approach was used to the one previously described in [64]. Briefly, tRNA LeuCAA was hybridised with a reverse complementary, biotinylated DNA-oligonucleotide (AGT CTG GCG CCT TAG ACC ACT CGG CCA TCC TGA CAA A [Biotin]) followed by immobilisation on streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Life Technologies). The hybridisation step was performed in 5× SSC buffer (20x: 3 M NaCl, 300 mM trisodium citrate [pH 7.0]) using 1 µl biotinylated oligonucleotide (100 µM) and 1 µg of SEC purified total tRNA per 25 µl beads. Samples were denatured at 90°C for 3 minutes, hybridised at 65°C for 10 minutes, and cooled to room temperature. The magnetic Dynabeads were washed as described in [64]. Immobilisation of the hybrid was performed at 25°C under shaking for 30 minutes. The supernatant containing nontarget tRNAs was removed, and the beads were washed once in 1× SSC buffer and three times in 0.1× SSC buffer. Finally, the beads were resuspended in 20 µl MilliQ water and heated to 80°C for 3 minutes to elute the target tRNA. No further DNase treatment was carried out. The isolated tRNA was digested with 10 µl digestion mix (final volume: 30 µL). Finally, 9 µl of the digested and isolated tRNA was coinjected with 1 µl stable isotope-labelled internal standards for measurement by MS [63].

### Sucrose density centrifugation

Sucrose gradients were used to separate subpolysomal and polysomal ribosomes. Sucrose gradients (10%–50% [w/v]) were prepared in gradient buffer (300 mM NaCl<sub>2</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM Tris-HCL [pH 7.5], 1 mM DTT, 0.1 mg/ml CHX).

Human dermal fibroblasts were grown and treated with sodium arsenite as described above. At 70%–80% confluency, cells were washed twice in PBS-CHX (100 µg/ml) and scraped into 500 µl lysis buffer (300 mM NaCl<sub>2</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM tris-HCL [pH 7.5], 1 mM DTT, 0.2 M sucrose, 0.1 mg/ml CHX, 0.5% IGEPAL, 100 U RNasin Plus RNase Inhibitor [N2615; Promega] per 0.5 ml). Cell lysates were incubated on ice for 3 minutes prior to pelleting the cells at 1,300g for 5 minutes. The supernatant was then layered on top of the gradient and

centrifuged at 38,000 rpm (acceleration 9, deceleration 6) for 2 hours at 4°C using an ultracentrifuge (Beckman Coulter). Gradients were fractionated using a gradient fractionation system (Presearch), and fractions were collected at 1-minute intervals using the FOXY Jr collection system (Presearch) at a flow rate of 1 ml/minute. Absorbance was measured constantly at 254 nm using a UA-6 UV-VIS detector (Presearch).

## Sequencing library preparation

For all sequencing experiments, total RNA was isolated from human dermal fibroblasts, as described. The quality of the RNA and prepared libraries was assessed using the appropriate high-sensitivity RNA and DNA microfluidics chip on the Agilent Bioanalyzer platform (Agilent Technologies). All cDNA libraries were subjected to a cleanup step with the use of Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) and further multiplexed for sequencing on a HiSeq platform (Illumina).

## RNA BS-seq

RNA BS-seq libraries were generated from untreated and sodium arsenite-treated human dermal fibroblasts for 2 or 4 hours. Two independent experiments were performed; the first consisted of 4 and the second of 5 replicates per genotype and time point. Thus, a total of 9 replicates per condition and genotype were processed and analysed. To generate the samples, RNA was prepared and BS-treated as previously described [11]. Briefly, 15 µg of total RNA was depleted from the ribosomal RNA population by using the Ribo-zero kit (MRZH11124, Illumina). Approximately 1–2 µg of rRNA-depleted samples were then BS-treated by mixing them with 42.5 µl 40% sodium BS solution (pH 5.0) and 17.5 µl DNA protection buffer supplied with the EpiTect Bisulfite Kit (59104; Qiagen). The reaction mixture was then incubated for three to four cycles of 5 minutes at 70°C, followed by 1 hour at 60°C on a thermal cycler. To desalt the reaction, all samples were passaged through Micro Bio-Spin 6 chromatography columns, following the manufacturer's instructions (732–6221; Bio-Rad), and next desulfonated by adding an equal volume of 1 M Tris (pH 9.0) to the reaction mixture and incubating for 1 hour at 37°C. BS-treated RNA samples were then precipitated overnight with 2.5 volumes of 100% ethanol, 0.1 volumes of 3 M sodium acetate (pH 5.5), and 1–2 µl Glycoblue (AM9516; Ambion). To repair the 2',3'-cyclic phosphate and 5'-hydroxyl termini produced during the BS/desulfonation reaction, T4 Polynucleotide Kinase (PNK) was used by mixing the RNA with 10x T4 PNK reaction buffer, 10 mM ATP, 10 U of T4 PNK enzyme, and RNase-free H<sub>2</sub>O to a final volume of 50 µl (M0201S; New England Biolabs). This was incubated at 37°C for 30 minutes, followed by a heat inactivation of the enzyme at 65°C for 20 minutes and an overnight precipitation of the RNA, as before. Approximately 400 ng of BS-converted RNA was finally used to generate BS-seq libraries. Taking into account that the above BS treatment and desulfonation protocol cleaves long RNAs into 100-nucleotide fragments, the TruSeq Small RNA preparation kit was used (Illumina) to generate platform-compatible libraries. In brief, kit-provided RNA-seq adapters were ligated to the BS-converted RNAs, reverse transcribed at 50°C for 1 hour with SuperScript III and 2 mM of each dNTP (18080085; Thermo Fisher Scientific), and followed by a PCR amplification programme, following the user manual's recommendations, to finalise the process.

## Standard and small RNA-seq

Standard RNA-seq libraries were generated from human dermal fibroblasts previously treated with sodium arsenite for 2 or 4 hours. All cell samples were processed in four replicates per condition. Total RNA was extracted as described and depleted from ribosomal RNA using the

Ribo-zero rRNA Removal Kit (MRZH11124, Illumina). The rRNA-depleted RNA was then used to generate RNA-seq libraries using the NEXTflex Rapid Directional RNA-seq Kit (5138–08; Illumina) or RNAHyper with Riboerase Kit (NEB).

Small RNA libraries were generated from human dermal fibroblasts treated with sodium arsenite for 2 or 4 hours, as described. At least four replicates per condition and genotype were processed and analysed. To generate the small RNA libraries, 10 µg of total RNA was subjected to a deaminoacylation reaction by mixing the purified RNA with 0.1 M Tris-HCl (pH 9.0), 1 mM EDTA, and RNase-free H<sub>2</sub>O to a final volume of 300 µl. This reaction was incubated for 30 minutes at 37°C to deaminoacylate mature tRNAs. To further size-select the RNA, samples were loaded on Novex TBE Urea 6% gels (EC68652BOX; Thermo Fisher) and the desired RNA fractions purified. TBE Urea gels were pre-run in 1x TBE buffer (for 5x stock: 54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 mL of 0.5 M EDTA [pH 8.0]) at 200 V for 30 minutes, while each sample was mixed with 2x Denaturing Sample Buffer (LC6876; Thermo Fisher) and denatured at 80°C for 5 minutes. To avoid renaturation, all samples were kept on ice. The polyacrylamide gels were then loaded with the RNA samples and the RNA Marker Low Easy ladder (R0002; Abnova) and run at 180 V for 1 hour. Each gel was next stained with ethidium bromide in 1x TBE buffer on a shaker for a few minutes, prior to being visualised over a UV transilluminator. Using a scalpel and the RNA ladder as a guide, 20–150 bp fragments were excised. The gel piece was placed in a 0.5 ml tube pierced with a needle to create perforations, fitted in a 2 ml RNase-free tube. To shatter the gel, the tubes were centrifuged for 5 minutes at maximum speed in a precooled 4°C benchtop centrifuge, and the gel pieces were eluted in 600 µl NaCl and 1 µl RNasin Plus RNase Inhibitor (N2615; Promega) overnight while rotating in a cold room. To remove any gel remnants and salts, each gel eluate was passed through a sterile Costar Spin-X centrifuge tube filter (CLS8160; Corning). The RNA flow-through was precipitated overnight, with ethanol and sodium acetate in –80°C. To collect the size-selected RNA, all samples were centrifuged for 30 minutes at maximum speed in a precooled 4°C benchtop centrifuge, the pellets washed with 70% ethanol, air dried, and finally resuspended in 12 µl RNase-free H<sub>2</sub>O. To prepare the ends of the fragments for adapter ligation and library preparation, the samples were first heated at 70°C for 10 minutes and then mixed with 10x T4 PNK Reaction Buffer, 20 U of T4 PNK enzyme, and RNase-free H<sub>2</sub>O to a final volume of 50 µl (M0201S; New England Biolabs). This was incubated at 37°C for 1 hour, followed by a heat inactivation of the enzyme at 65°C for 20 minutes and a final phenol:chloroform cleanup step and overnight ethanol precipitation. The final RNA pellet was resuspended in 7 µl RNase-free H<sub>2</sub>O. The libraries were generated using the TruSeq Small RNA Preparation Kit (Illumina), for which 3' adenylated and 5' phosphorylated adapters, suitable for Illumina RNA-seq, were ligated to an average of 400 ng small purified RNA fractions. Samples were then reverse transcribed at 50°C for 1 hour with the SuperScript III cDNA synthesis kit (18080085; Thermo Fisher Scientific), followed by a PCR amplification programme with Phusion DNA polymerase (F530S; Thermo Fisher Scientific).

## Sequencing data analyses

For all sequencing datasets, automatically generated FastQC reports (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) were used for the initial assessment of the quality and basic processing of the reads. Sequencing adapters were trimmed from the 5' and 3' ends of the reads using cutadapt (v.1.8.1; <https://pypi.python.org/pypi/cutadapt/1.8.1>).

For standard RNA-seq data, adapters were removed and paired-end RNA-seq reads were aligned to the human reference genome (GRCh38/g38) using Tophat2 (v.2.0.9; options: –read-mismatch 2 –max-multihits 1 –GTF) guided by ENSEMBL gene models (release 82), while

allowing for two mismatches per read and unique alignments only. In order to determine the mRNA abundance, RNA-seq read counts for the full transcript were obtained using feature-Counts (v1.5.0-p1; <http://subread.sourceforge.net>; options: -O—minOverlap 10 -p -C -M -B -t exon -g gene\_id -T 6 -a). The datasets were then normalised, and the statistical significance of differential expression was evaluated by using the R/Bioconductor DESeq2 package (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>).

To determine RNA methylation levels using RNA BS-seq data, a tailored approach to the one previously published was followed [11]. BS-seq reads were aligned to the human reference genome (GRCh38/hg38) by using Bismark (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark>; v.0.14.4; options: ‘-directional-n 1 -l 100’). To complete the mapping, tRNA gene predictions were obtained from GtRNadb (<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNadb>). Heatmaps displaying either C or T in the aligned reads at each cytosine position were generated using custom PERL scripts and matrix2png (<http://www.chibi.ubc.ca/matrix2png/>) for visualisation. Cytosine positions on the heatmaps were reported relative to the annotated transcriptional start sites of the documented beginning of each tRNA.

For small RNA-seq data and to determine the abundance of tRNA fragments, a tailored approach was followed [11] in which first adapter-trimmed paired-end reads were mapped to the human reference genome (GRCh38/hg38) using bowtie (v.2.1.0; <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2>; options:—no-mixed—no-discordant—end-to-end), while considering only reads that mapped uniquely to the genome. To annotate the tRNA-seq fragments, tRNA genes were downloaded from GtRNadb (<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNadb>). Counts per tRNA fragments were normalised, and their respective abundances were statistically evaluated using the R/Bioconductor DESeq2 package (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) and represented as log<sub>2</sub>(DESeq2-normalised counts).

For tRNA fragment analyses, four replicates per condition and genotype were used from the second biological replicate. To identify tRNA-derived sequences, all significant fragments ( $p < 0.01$ ) in NSUN2–/– cells versus NSUN2+/+ cells after 4 hours of sodium arsenite treatment were selected and filtered for fragments smaller than 40 nucleotides. All rows with missing values (0) in any condition were excluded. The PCAs and heatmaps show all four or the most similar three replicates. PCA and heatmaps were generated using <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>.

Gene set enrichment analyses were done using Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) [65,66]. To analyse the affected biological processes and cellular pathways in response to stress, we used the RNA-seq data obtained from human dermal fibroblasts and performed gene enrichment analyses using GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>) [67]. As running mode, we used ‘two ranked lists of genes’ using the 2,799 commonly regulated as a background list.

## Cell cycle and apoptosis

For cell cycle analyses, human dermal fibroblasts untreated and treated with sodium arsenite were briefly rinsed with PBS and collected with Trypsin-EDTA (1:1 in PBS). Following two consecutive washes with cold PBS, the cells were fixed and resuspended in ice-cold 70% ethanol. All samples were kept at 4°C until further processing. The samples were centrifuged at 12,000g for 5 minutes and rinsed twice with PBS. All pellets were resuspended in 3 ml PBS containing DAPI dye (1:3,000) and incubated at room temperature for 30–45 minutes while protected from light. The fluorescence of each sample was measured on a flow cytometer at 450/50 405 nm. To analyse the data, DAPI fluorescence measurements were visualised by histogram and the cell cycle phases determined by the curves and x-axis values.

For cell viability analyses, human dermal fibroblasts untreated and treated with sodium arsenite were assayed with the FITC Annexin V kit following the manufacturer's recommendations (556419; BD Biosciences). Briefly, cells were rinsed with PBS and collected with Trypsin-EDTA (1:1 in PBS). The fluorescence of each sample was measured at 530/30 488 nm and 610/20 561 nm. To analyse the data, fluorescence measurements were visualised by scatterplot, while compensation and quadrants were set up based on control samples of unstained cells, cells only stained with FITC Annexin V (no PI), and cells stained with PI (no FITC Annexin V).

### Global mRNA translation analysis

To investigate global protein synthesis, human dermal fibroblasts untreated and treated with sodium arsenite, recombinant angiogenin, or tRNA fragments were complemented with OP-puro and further labelled as previously described [16]. Reconstituted OP-puro (50  $\mu$ M; 10 mM reconstituted stock [pH 6.4]; Medchem Source) was added to each sample in culture medium precisely 1 hour prior to collection. In each assay, a sample not treated with OP-puro served as a negative control, and as a positive control, samples treated with 50  $\mu$ g/mL CHX (100 mg/ml in DMSO, C4859; Sigma-Aldrich) for 15 minutes were used. Cells were rinsed with PBS and then collected with Trypsin-EDTA (1:1 in PBS). After pelleting the collected cells and washing them once with PBS, these were resuspended in 0.5 ml PFA (1% w/v in PBS; Santa Cruz) and kept for 15 minutes on ice in the dark. Following fixation, samples were washed in PBS and permeabilised in PBS supplemented with 3% FBS and 0.1% Saponin (47036; Sigma-Aldrich) for 5 minutes at room temperature. To conjugate OP-puro to a fluorochrome, an azide-alkyne cycloaddition was performed for 30 minutes at room temperature in the dark. For this, the Click-iT Cell Reaction Buffer Kit (C10269; Life Technologies) and 5  $\mu$ M of Alexa Fluor 555-Azide (A20012; Life Technologies) were used. To remove excess reagents and reduce the background signal, the cells were washed twice in PBS supplemented with 3% FBS and 0.1% Saponin. Finally, all samples were resuspended in PBS containing DAPI (1:3,000) and kept at 4°C until further analysis. The fluorescence of each sample was measured at 450/50 405 nm for DAPI and 585/15 561 nm for OP-puro. To analyse the data, fluorescence measurements were visualised by histogram, and the raw fluorescence values were extracted.

To visualise polypeptide synthesis in cultured cells, human dermal fibroblasts were grown directly on autoclaved glass coverslips placed in 12-well culture plates. Cell culture, sodium arsenite treatments, and the incorporation of OP-puro were carried out as described. To fix the cells, the glass coverslips were first briefly rinsed with 1x PBS and incubated for 15 minutes at room temperature with PFA (4% PFA in PBS; Santa Cruz). To permeabilise the cells and additionally block unspecific antibody binding, all coverslips were first incubated with 0.4% Triton X-100 in PBS for 15 minutes and next with 3% BSA in PBS for 1 hour at room temperature. To conjugate OP-puro to a fluorochrome, an azide-alkyne cycloaddition was performed for 30 minutes at room temperature and in the dark. For this, the Click-iT Cell Reaction Buffer Kit (C10269; Life Technologies) and 5  $\mu$ M of Alexa Fluor 555-Azide (A20012; Life Technologies) were used. To remove excess reagents and reduce the background signal, the cells were washed once with 3% BSA in PBS. OP-puro-labelled cells were counterstained for their nuclei by using Hoechst (working dilution 0.5  $\mu$ g/mL) for 10 minutes and mounted on glass slides with a PBS:glycerol solution (1:1). Glass slides were stored in the dark at 4°C until imaging.

### Flow cytometry data acquisition and analysis

Flow cytometry analysis of all cell assays described was performed with the LSRFortessa Flow Cytometer (BD Biosciences). Data were analysed using the FlowJo software. All samples were gated using forward versus side scatter to eliminate debris.



## Image acquisition and analysis

All bright-field and immunofluorescence images were acquired using an Axio Imager 2 Upright Research Microscope (Zeiss) with ORCA-Flash4.0 digital camera (Hamamatsu) or AxioCam MRc colour digital camera (Zeiss). All images were initially processed using the ZEN Microscope and Imaging Software and later the Adobe Photoshop CS6 package. The CellProfiler software packages were used for image quantifications and analysis. Finally, all images and figures were arranged using Adobe Illustrator CS7.

## Data analysis and statistical tests

Data analysis and plotting were performed with the RStudio package and the GraphPad Prism 7 software. Statistical tests were performed with GraphPad Prism 7. If not stated otherwise, data are presented as mean values, and error bars represent standard deviation (SD).

## Supporting information

**S1 Fig. Metabolic profiles of NSUN2-expressing and -lacking cells.** (A) Schematic representation of stem cell differentiation in the absence or presence of NSUN2. (B) Marker expression and cellular differences in hair follicles expressing or lacking NSUN2. (C) Gating used for flow cytometry sorting of BG stem cells (ITGA6<sup>high</sup>/CD34<sup>+</sup>) in telogen (P49) wild-type and NSUN2<sup>-/-</sup> mice. (D) Gating used for flow cytometry sorting of HG progenitor cells (ITGA6<sup>low</sup>/PCAD<sup>+</sup>) in telogen (P49) wild-type and NSUN2<sup>-/-</sup> mice. (E,F) Log2 FC (E) and Gene Ontology categories (F) of combined differential expressed genes (FDR < 0.05) in anagen and progenitor (ITGA6<sup>low</sup>/PCAD<sup>+</sup>) populations from skin of NSUN2<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice. (G) Schematic representation of NSUN-dependent methylation at cytosine-5. (H) Overview of the one-carbon metabolism network. (I-N) Metabolic differences between NSUN2<sup>+/+</sup> and NSUN2<sup>-/-</sup> mice relating to the methionine cycle (I,L), free amino acids (J,M), and free nucleotides (K,N) measured by NMR-based (I-K) or MS-based (L-N) metabolic profiling (*n* = 3–5 mice). (O) Model of how protein homeostasis changes the balance between protein synthesis and degradation in NSUN<sup>+/+</sup> (upper panel) and NSUN2<sup>-/-</sup> (lower panel) cells. The underlying data for this figure can be found in [S2 Data](#) and [S1 File](#). BG, bulge; DP, dermal papilla; FC, fold-change; FDR, false discovery rate; HG, hair germ; IFE, interfollicular epidermis; ITGA6, integrin alpha-6; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; PCAD, P-cadherin; SAH, S-adenosyl-homocysteine; SAM, S-adenosyl-methionine; SG, sebaceous gland. (TIF)

**S2 Fig. Rescue for loss of NSUN2 by reexpressing the wild-type or enzymatic dead protein.** (A, B) Differentially expressed genes in NSUN2<sup>-/-</sup> compared to NSUN2<sup>+/+</sup> cells (A) and *Nsun2* RNA levels in NSUN2<sup>+/+</sup>, <sup>+/-</sup>, and <sup>-/-</sup> cells (B) measured by RNA sequencing. (C, D) The transcriptional profile of NSUN2<sup>-/-</sup> cells overexpressing the NSUN2 protein is largely unaltered (C) although *Nsun2* is highly expressed (D). Expression of the empty ('e.') vector served as a control. (E) Venn diagram of differentially expressed genes (*p*<sub>adj</sub> < 0.01) in NSUN2<sup>-/-</sup> versus <sup>+/+</sup> compared to NSUN2-rescued cells. (F) Two out of three replicates of polysome profiles using NSUN2<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> cells. (G) Schematic representation of OP-puro incorporation in actively translating ribosomes. OP-puro mimics an amino-acyl-loaded tRNA molecule. (H) Example raw data outputs from OP-puro fluorescence analysis using a flow cytometer. CHX served as a control. (I) Protein synthesis measured by OP-puro incorporation in NSUN2<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> cells after incubation with an angiogenin inhibitor (ANGi). (J) Western blot for NSUN2 and tubulin after incubation with 500 or 1,000 nM RAPA for 12 or 24 hours (h). (K) Quantification of protein expression shown in (J). (L) De novo protein synthesis in

*NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> after incubation with RAPA or CHX. DMSO served as a vehicle control (J-L). (M, N) Metabolic differences of *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells rescued with the empty vector ('e.v.'), K190M, or the NSUN2 protein shown as a PCA plot (M) or as Log<sub>2</sub> FC differences of the significant different ( $p < 0.01$  NSUN2 versus e.v.) metabolites (N). The underlying data for this figure can be found in [S4](#) and [S7](#) Data and [S1 File](#). CHX, cycloheximide; OP-puro, O-propargyl-puromycin; PCA, principle component analysis; RAPA, rapamycin; tRNA, transfer RNA. (TIF)

**S3 Fig. NSUN2 regulates cell cycle phases and global protein synthesis during the cellular stress response.** (A) Example raw data outputs from OP-puro fluorescence analysis using a flow cytometer for human dermal fibroblasts treated with sodium arsenite. Dotted line represents the mean level of OP-puro positive control. (B) Immunofluorescence detection of OP-puro incorporation in human dermal fibroblasts. DAPI: nuclear counterstain. Scale bar: 20  $\mu$ m. (C) Measurement of OP-puro fluorescence intensity in cells using microscope-acquired images. Each dot represents one cell. Data are represented as median. (D) Second replicate of polysome profiling of *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells rescued with wt or mutated NSUN2 (K190M). The empty vector ('e.v.')->infected cells served as control (see [Fig 3F–3I](#)). (E) Example of raw data output from AnV and PI analysis to measure cell death. (F, G) Percentage of cells that are viable, apoptotic, or necrotic in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells exposed to sodium arsenite for the indicated hours (hr) ( $n = 3$  samples per time point). (H) Summary of cell cycle distribution shown in [Fig 3A–3D](#). Data represented as mean in (K–H). Error bars are  $\pm$ SD. The underlying data for this figure can be found in [S1 File](#). AnV, AnnexinV; OP-puro, O-propargyl-puromycin; PI, propidium iodide; wt, wild-type. (TIF)

**S4 Fig. RNA methylation levels change dynamically in response to oxidative stress.** (A) Immunofluorescence detection of the stress granules markers eIF4A1 (upper panels) and p-eIF2A (lower panels) in untreated (control) or sodium arsenite-treated *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells. DAPI: nuclear counterstain. Scale, 20  $\mu$ m. (B) *Nsun2* RNA levels in response to UVB exposure in primary human keratinocytes and dermal fibroblasts. (C) Western blot for NSUN2 in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells incubated with vehicle control (DMSO, PBS). (D) Experimental outline of sample collection and RNA BS sequencing. (E,F) Quantification of tRNA methylation percentage of NSUN2-dependent (E) and -independent (F) sites in a second independent experiment ( $n = 5$  samples per time point). (G) Second independent RNA BS-seq data shown as heatmap of methylation status of individual tRNA molecules in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells. (H, I) Quantification of methylation changes in the tRNAs Leu<sup>CAA</sup> and Asp<sup>GTC</sup> in *NSUN2*<sup>+/+</sup> and *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells shown in (E). Data represented as median in (E, F, H, I). One-way ANOVA adjusted  $p$ -value (H,I),  $**p < 0.005$ ,  $***p < 0.0005$ ,  $****p < 0.0001$ . The underlying data for this figure can be found in [S8 Data](#) and [S1 File](#). BS, bisulfite; BS-seq, BS sequencing; eIF2, eukaryotic Initiation Factor 2; tRNA, transfer RNA. (TIF)

**S5 Fig. Dynamic levels of NSUN2, tRFs, and methylation in response to stress.** (A) Reexpression of NSUN2 but not K190M in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells restores methylation to similar levels of endogenous NSUN2 (*NSUN2*<sup>+/+</sup>). (B) Western blot for NSUN2 in *NSUN2*<sup>-/-</sup> cells infected with an empty ('E.') vector control, the enzymatic dead K190M, or the wild-type NSUN2 construct in cells untreated (0) or treated for 2 and 4 hours (h) with sodium arsenite. HSP90 served as a loading control. (C) Raw data (reads) for the indicated tRNAs obtained from small RNA sequencing in NSUN2-expressing (*NSUN2*<sup>+/+</sup>; black) or -lacking (*NSUN2*<sup>-/-</sup>; red) untreated (0h) or (h) treated 2 and 4 hours with arsenite. (D, E) Methylation levels (pooled from 5 replicates) of



cytosines along tRNA 71-Leu CAG (C) and 1-His GTG (F) detecting m<sup>5</sup>C sites, in the variable loop (D) and C70 (E). The underlying data for this figure can be found in [S10 Data](#) and [S1 File](#). HSP90, heat shock protein 90; m<sup>5</sup>C, 5-methylcytosine; tRF, tRNA-derived fragment; tRNA, transfer RNA.

(TIF)

**S6 Fig. Site-specific methylation shapes tRF formation to regulate protein synthesis.** (A–C) Comparison of site-specific tRNA methylation and fragmentation in *NSUN2*<sup>+/+</sup> (red) and *NSUN2*<sup>–/–</sup> (blue) cells. (*n* = 4 samples per time point). Data represent median and range. Adjusted *p*-value: one-way ANOVA. \*\**p* < 0.005, \*\*\**p* = 0.0005. (D) Log<sub>2</sub> FC of the down-regulated tRFs when *NSUN2*-overexpressing cells are exposed to stress for 4 hours. tRNA lysine-derived tRFs are highlighted in red; tRNA histidine-derived tRFs are highlighted in blue. Line indicates the mean. (E) Treatment regime to measure global protein synthesis of *NSUN2*<sup>+/+</sup> and <sup>–/–</sup> cells transfected with tRNA Glu<sup>CTC</sup>-derived 5' and 3' tRFs after exposure to sodium arsenite. (F, G) Log<sub>2</sub> FC of protein synthesis in *NSUN2*<sup>+/+</sup> (F) and *NSUN2*<sup>–/–</sup> (G) in response to synthetic 5' or 3' tRFs. (*n* = 3 samples per time point). (H) A fluorescence siRNA was used as a control for transfection efficiency. The underlying data for this figure can be found in [S11](#) and [S12 Data](#) and the [S1 File](#). FC, fold-change; siRNA, small interfering RNA; tRF, tRNA-derived fragment; tRNA, transfer RNA.

(TIF)

**S7 Fig. Mitochondrial activity is reduced and catabolic pathways enhanced in the absence of NSUN2.** (A, B) Mitochondrial activity ('mito') and protein synthesis ('OP-puro') after exposure to arsenite for the indicated time (hours) or CHX in *NSUN2*<sup>+/+</sup> (A) and *NSUN2*<sup>–/–</sup> (B) cells. (C) GO analyses using Ribo seq data in *NSUN2*<sup>–/–</sup> cells rescued with *NSUN2* or the enzymatic dead versions of *NSUN2* C321A (left panel) and C271A (right panel). (D, E) PCA plot (D) and heatmap (E) of genes belonging to the GO: nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay. The underlying data for this figure can be found in [S15 Data](#) and [S1 File](#). CHX, cycloheximide; GO, Gene Ontology; OP-puro, O-propargyl-puromycin; PCA, principle component analysis; seq, sequencing.

(TIF)

**S1 Data. Mouse skin microarray complete dataset.**

(XLSX)

**S2 Data. Mass spectrometry raw data.** S2A: Mass spectrometry data for human dermal fibroblasts; S2B: Mass spectrometry data for mouse skin; S2C: NMR data for mouse skin. NMR, nuclear magnetic resonance.

(XLSX)

**S3 Data. Multiple *t* test for metabolites shown in [Fig 1I–1K](#).**

(XLSX)

**S4 Data. RNA sequencing data.** S4A: RNA sequencing data of *NSUN2*<sup>+/+</sup>, *NSUN2*<sup>+/-</sup>, and two lines of *NSUN2*<sup>–/–</sup> human dermal fibroblasts. S4B: RNA sequencing data *NSUN2*<sup>–/–</sup> cells reexpressing the *NSUN2* protein or the empty vector as a control.

(XLSX)

**S5 Data. RNA bisulfite sequencing of *NSUN2*<sup>–/–</sup> cells rescued with the wild-type *NSUN2* construct or the enzymatic dead *NSUN2* construct K190M, and the empty vector as a control.**

(XLSX)

**S6 Data. Small RNA sequencing of rescued *NSUN2*–/– cells using the wild-type or enzymatic dead version of *NSUN2* or the empty vector as control.**

(XLSX)

**S7 Data. Mass spectrometry data for rescued *NSUN2*–/– cells using the wild-type or enzymatic dead version of *NSUN2* or the empty vector as control.**

(XLSX)

**S8 Data. RNA BS sequencing data.** S8A: BS-seq tRNA methylated sites ( $n = 4$  conversion assays) from first experimental replicate. S8B: BS-seq tRNA methylated sites ( $n = 5$  conversion assays) from second independent experimental replicate. BS, bisulfite; BS-seq, BS sequencing; tRNA, transfer RNA.

(XLSX)

**S9 Data. RNA BS sequencing data identifying other potentially non-tRNA targeted sites by *NSUN2*.** S9A: BS-seq to detect other potentially non-tRNA targeted sites by *NSUN2* from 1 replicate ( $n = 4$  conversion assays). S9B: BS-seq to detect other all sites not targeted by *NSUN2* from 1 replicate ( $n = 4$  conversion assays). BS, bisulfite; tRNA, transfer RNA.

(XLSX)

**S10 Data. RNA BS sequencing data of unstressed and stressed *NSUN2*–/– cells infected with the empty vector control, the wild-type *NSUN2*, or the enzymatic dead construct K190M.** BS, bisulfite.

(XLSX)

**S11 Data. Small RNA sequencing in unstressed and stressed cells.** S11A: tRNA fragments found in the small RNA-seq dataset. S11B: tRNA fragment sequencing and analysis ( $p < 0.01$  *NSUN2*–/– at 2 hours of stress). S11C: tRNA fragment sequencing and analysis (samples with missing values removed). S11D: tRNA fragment sequencing and analysis (fragments smaller than 40 nucleotides). RNA-seq, RNA sequencing; tRNA, transfer RNA.

(XLSX)

**S12 Data. tRNA fragments in *NSUN2*, K190M, or empty vector infected cells after 0, 2, and 4 hours of treatment with sodium arsenite.**

(XLSX)

**S13 Data. RNA sequencing data.** S13A: RNA-seq data from human dermal fibroblasts untreated ('ctr') or treated with sodium arsenite for 2 or 4 hours. Shown are transcriptional differences between *NSUN2*–/– and *NSUN2* +/+ cells in the control. S13B: RNA-seq data from human dermal fibroblasts untreated ('ctr') or treated with sodium arsenite for 2 or 4 hours. Shown are transcriptional differences between *NSUN2*–/– and *NSUN2* +/+ cells after 2 hours of stress. S13C: RNA-seq data from human dermal fibroblasts untreated ('ctr') or treated with sodium arsenite for 2 or 4 hours. Shown are transcriptional differences between *NSUN2*–/– and *NSUN2* +/+ cells after 4 hours of stress. RNA-seq, RNA sequencing.

(XLSX)

**S14 Data. Gene ontology analyses.** S14A: Gene enrichment (Cellular processes\_Gorilla) for differentially expressed genes in *NSUN2*+/+ versus *NSUN2*–/– cells after 2 hours of exposure to sodium arsenite. S14B: Gene enrichment (Cellular processes\_Gorilla) for differentially expressed genes in *NSUN2*+/+ versus *NSUN2*–/– cells after 4 hours of exposure to sodium arsenite. S14C: Gene enrichment (Cellular processes\_Gorilla) for differentially expressed genes in *NSUN2*+/+ versus *NSUN2*–/– cells in untreated condition revealed no significant

enrichment.  
(XLSX)

**S15 Data. Ribo seq data of *NSUN2*–/– cells rescued with *NSUN2* (wt) or enzymatic dead versions of the *NSUN2* protein (C321C, C271A) or the empty vector ('empty') as control.**  
wt, wild type.  
(XLSX)

**S16 Data. Individual mass spectrometric parameters for the nucleosides.**  
(XLSX)

**S1 File. Underlying data for Figs [1C–1E](#), [1I–1K](#), [2B–2D](#), [2D–2N](#), [3C–3E](#), [3K–3M](#), [4E](#), [4F](#), [4H](#), [4J](#), [5A–5E](#), [5G–5P](#), [6D](#) and [6G–6I](#) and [S1E](#), [S1F](#), [S1I–S1N](#), [S2B](#), [S2D](#), [S2I–S2L](#), [S2N](#), [S3C](#), [S3F–S3H](#), [S4B](#), [S4E](#), [S4F](#), [S4H](#), [S4I](#), [S5A](#), [S5D](#), [S5E](#), [S6A–S6D](#), [S6F–S6H](#), [S7A–S7C](#) and [S7E](#) Figs.**  
(XLSX)

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge the support of the Wellcome-MRC Cambridge Stem Cell Institute facilities and, in particular for this work, Maike Paramor, Irina Pshenichnaya, Gemini Chu, Peter Humphreys, and Andy Riddell. We also thank the Cancer Research UK Cambridge Institute Genomics Core facility for their support. S. K. thanks Thomas Carell and his group for instrument time (LC-MS/MS).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Nikoletta A. Gkatza, Sandra Blanco, Anne E. Willis, Michaela Frye.

**Data curation:** Susanne Bornelöv, Sabine Dietmann.

**Formal analysis:** Nikoletta A. Gkatza, Cecilia Castro, Robert F. Harvey, Matthias Hei, Martyna C. Popis, Sandra Blanco, Susanne Bornelöv, James A. West, Stefanie Kellner, Sabine Dietmann, Michaela Frye.

**Funding acquisition:** Michaela Frye.

**Investigation:** Nikoletta A. Gkatza, Cecilia Castro, Martyna C. Popis, Sandra Blanco, Abdulrahim A. Sajini, Michaela Frye.

**Methodology:** Nikoletta A. Gkatza, Cecilia Castro, Susanne Bornelöv, Joseph G. Gleeson, Julian L. Griffin, James A. West, Stefanie Kellner, Anne E. Willis, Sabine Dietmann.

**Resources:** Joseph G. Gleeson, Julian L. Griffin, Michaela Frye.

**Software:** Susanne Bornelöv.

**Supervision:** Anne E. Willis, Michaela Frye.

**Validation:** Nikoletta A. Gkatza, Cecilia Castro, Robert F. Harvey, Matthias Hei, Martyna C. Popis, Abdulrahim A. Sajini, Anne E. Willis, Sabine Dietmann, Michaela Frye.

**Visualization:** Nikoletta A. Gkatza.

**Writing – original draft:** Nikoletta A. Gkatza, Michaela Frye.

**Writing – review & editing:** Nikoletta A. Gkatza.

## References

1. Van Heyningen V, Yeyati PL. Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease. *Hum Mol Genet*. 2004; 13 Spec No 2:R225–33. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh254> PMID: 15358729.
2. Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*. 2002; 108(4):501–12. PMID: 11909521.
3. Frye M, Harada BT, Behm M, He C. RNA modifications modulate gene expression during development. *Science*. 2018; 361(6409):1346–9. Epub 2018/09/29. <https://doi.org/10.1126/science.aau1646> PMID: 30262497.
4. Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46(D1):D303–D7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1030> PMID: 29106616; PubMed Central PMCID: PMC5753262.
5. Frye M, Blanco S. Post-transcriptional modifications in development and stem cells. *Development*. 2016; 143(21):3871–81. <https://doi.org/10.1242/dev.136556> PMID: 27803056.
6. Khan MA, Rafiq MA, Noor A, Hussain S, Flores JV, Rupp V, et al. Mutation in NSUN2, which Encodes an RNA Methyltransferase, Causes Autosomal-Recessive Intellectual Disability. *Am J Hum Genet*. 2012; 90(5):856–63. Epub 2012/05/01. S0002-9297(12)00203-0 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.023> PMID: 22541562.
7. Martinez FJ, Lee JH, Lee JE, Blanco S, Nickerson E, Gabriel S, et al. Whole exome sequencing identifies a splicing mutation in NSUN2 as a cause of a Dubowitz-like syndrome. *J Med Genet*. 2012; 49(6):380–5. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100686> PMID: 22577224.
8. Van Haute L, Dietmann S, Kremer L, Hussain S, Pearce SF, Powell CA, et al. Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat Commun*. 2016; 7:12039. <https://doi.org/10.1038/ncomms12039> PMID: 27356879.
9. Nakano S, Suzuki T, Kawarada L, Iwata H, Asano K, Suzuki T. NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA(Met). *Nature chemical biology*. 2016; 12(7):546–51. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2099> PMID: 27214402.
10. Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*. 2010; 24(15):1590–5. Epub 2010/08/04. 24/15/1590 [pii] <https://doi.org/10.1101/gad.586710> PMID: 20679393.
11. Blanco S, Dietmann S, Flores JV, Hussain S, Kutter C, Humphreys P, et al. Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *The EMBO journal*. 2014; 33(18):2020–39. <https://doi.org/10.15252/emboj.201489282> PMID: 25063673; PubMed Central PMCID: PMC4195770.
12. Blanco S, Bandiera R, Popis M, Hussain S, Lombard P, Aleksic J, et al. Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis. *Nature*. 2016; 534(7607):335–40. <https://doi.org/10.1038/nature18282> PMID: 27306184.
13. Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell*. 2011; 43(4):613–23. Epub 2011/08/23. S1097-2765(11)00524-7 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.022> PMID: 21855800; PubMed Central PMCID: PMC3160621.
14. Flores JV, Cordero-Espinoza L, Oeztuerk-Winder F, Andersson-Rolf A, Selmi T, Blanco S, et al. Cytosine-5 RNA Methylation Regulates Neural Stem Cell Differentiation and Motility. *Stem Cell Reports*. 2017; 8(1):112–24. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.11.014> PMID: 28041877; PubMed Central PMCID: PMC5233436.
15. Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K, Martin-Villalba A. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*. 2015; 17(3):329–40. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.002> PMID: 26235341.
16. Signer RA, Magee JA, Salic A, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature*. 2014; 509(7498):49–54. <https://doi.org/10.1038/nature13035> PMID: 24670665; PubMed Central PMCID: PMC4015626.
17. Baser A, Skabkin M, Kleber S, Dang Y, Gulculer Balta GS, Kalamakis G, et al. Onset of differentiation is post-transcriptionally controlled in adult neural stem cells. *Nature*. 2019; 566(7742):100–4. Epub 2019/02/01. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0888-x> PMID: 30700908.
18. Blanco S, Kurowski A, Nichols J, Watt FM, Benitah SA, Frye M. The RNA-methyltransferase Misu (NSun2) poises epidermal stem cells to differentiate. *PLoS Genet*. 2011; 7(12):e1002403. Epub 2011/12/07. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002403> PGENETICS-D-11-00619 [pii]. PMID: 22144916; PubMed Central PMCID: PMC3228827.
19. Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol*.

- 2003; 120(4):501–11. Epub 2003/03/22. 12088 [pii] <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12088.x> PMID: [12648211](#).
20. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 2004; 118(5):635–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.012> PMID: [15339667](#).
21. Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, et al. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(2):155–69. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.12.009> PMID: [19200804](#).
22. Bujnicki JM, Feder M, Ayres CL, Redman KL. Sequence-structure-function studies of tRNA:m<sup>5</sup>C methyltransferase Trm4p and its relationship to DNA:m<sup>5</sup>C and RNA:m<sup>5</sup>U methyltransferases. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(8):2453–63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh564> PMID: [15121902](#).
23. Hussain S, Sajini AA, Blanco S, Dietmann S, Lombard P, Sugimoto Y, et al. NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell reports*. 2013; 4(2):255–61. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.029> PMID: [23871666](#); PubMed Central PMCID: PMC3730056.
24. Yang X, Yang Y, Sun BF, Chen YS, Xu JW, Lai WY, et al. 5-methylcytosine promotes mRNA export—NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m<sup>5</sup>C reader. *Cell Res*. 2017; 27(5):606–25. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.55> PMID: [28418038](#); PubMed Central PMCID: PMC5594206.
25. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell metabolism*. 2017; 25(1):27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009> PMID: [27641100](#); PubMed Central PMCID: PMC5353360.
26. Kalhan SC. One carbon metabolism in pregnancy: Impact on maternal, fetal and neonatal health. *Molecular and cellular endocrinology*. 2016; 435:48–60. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.006> PMID: [27267668](#); PubMed Central PMCID: PMC5014566.
27. Yang M, Vousden KH. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16(10):650–62. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.81> PMID: [27634448](#).
28. Mentch SJ, Mehrmohamadi M, Huang L, Liu X, Gupta D, Mattocks D, et al. Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell metabolism*. 2015; 22(5):861–73. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.024> PMID: [26411344](#); PubMed Central PMCID: PMC4635069.
29. Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res*. 2009; 60(6):448–60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.002> PMID: [19682580](#); PubMed Central PMCID: PMC2767414.
30. Hussain S, Benavente SB, Nascimento E, Dragoni I, Kurowski A, Gillich A, et al. The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability. *J Cell Biol*. 2009; 186(1):27–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810180> PMID: [19596847](#).
31. Lyons SM, Fay MM, Akiyama Y, Anderson PJ, Ivanov P. RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. *RNA Biol*. 2017; 14(2):171–8. Epub 2016/12/25. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1272746> PMID: [28010172](#); PubMed Central PMCID: PMC5324756.
32. Liu J, Xu Y, Stoleru D, Salic A. Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(2):413–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111561108> PMID: [22160674](#); PubMed Central PMCID: PMC3258597.
33. Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology*. 2010; 6(3):209–17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304> PMID: [20118940](#); PubMed Central PMCID: PMC2831214.
34. Orioli A. tRNA biology in the omics era: Stress signalling dynamics and cancer progression. *Bioessays*. 2017; 39(3). <https://doi.org/10.1002/bies.201600158> PMID: [28026052](#).
35. Kong Q, Lin CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(11):1817–29. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0277-y> PMID: [20148281](#); PubMed Central PMCID: PMC3010397.
36. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010; 2010:214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074> PMID: [20182529](#); PubMed Central PMCID: PMC2825543.
37. McCollum G, Keng PC, States JC, McCabe MJ Jr., Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937 myeloid leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 313(2):877–87. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.080713> PMID: [15722406](#).
38. Yang K, Wang M, Zhao Y, Sun X, Yang Y, Li X, et al. A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nat Commun*. 2016; 7:13599. <https://doi.org/10.1038/ncomms13599> PMID: [27886181](#); PubMed Central PMCID: PMC5133708.



39. Frye M, Watt FM. The RNA methyltransferase Misu (NSun2) mediates Myc-induced proliferation and is upregulated in tumors. *Curr Biol*. 2006; 16(10):971–81. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.027> PMID: [16713953](#).
40. Pollex T, Hanna K, Schaefer M. Detection of cytosine methylation in RNA using bisulfite sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010; 5(10). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5505> PMID: [20889702](#)
41. Kao RY, Jenkins JL, Olson KA, Key ME, Fett JW, Shapiro R. A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(15):10066–71. Epub 2002/07/16. <https://doi.org/10.1073/pnas.152342999> [pii]. PMID: [12118120](#); PubMed Central PMCID: PMC126625.
42. Cole C, Sobala A, Lu C, Thatcher SR, Bowman A, Brown JW, et al. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA*. 2009; 15(12):2147–60. <https://doi.org/10.1261/rna.1738409> PMID: [19850906](#); PubMed Central PMCID: PMC2779667.
43. Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, Zhu J, et al. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett*. 2009; 583(2):437–42. Epub 2008/12/31. S0014-5793(08)01035-1 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.043> PMID: [19114040](#).
44. Goodarzi H, Liu X, Nguyen HC, Zhang S, Fish L, Tavazoie SF. Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement. *Cell*. 2015; 161(4):790–802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.053> PMID: [25957686](#); PubMed Central PMCID: PMC4457382.
45. Gebetsberger J, Wyss L, Mleczko AM, Reuther J, Polacek N. A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. *RNA Biol*. 2017; 14(10):1364–73. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1257470> PMID: [27892771](#); PubMed Central PMCID: PMC5711459.
46. Sharma LK, Lu J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem*. 2009; 16(10):1266–77. PMID: [19355884](#); PubMed Central PMCID: PMC4706149.
47. Lindqvist LM, Tandoc K, Topisirovic I, Furic L. Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2018; 48:104–11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.11.003> PMID: [29179096](#); PubMed Central PMCID: PMC5869074.
48. Buszczak M, Signer RA, Morrison SJ. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. *Cell*. 2014; 159(2):242–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.016> PMID: [25303523](#); PubMed Central PMCID: PMC4222182.
49. Pan T. Modifications and functional genomics of human transfer RNA. *Cell Res*. 2018; 28(4):395–404. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0013-y> PMID: [29463900](#).
50. Chan CT, Pang YL, Deng W, Babu IR, Dyavaiah M, Begley TJ, et al. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun*. 2012; 3:937. Epub 2012/07/05. ncomms1938 [pii] <https://doi.org/10.1038/ncomms1938> PMID: [22760636](#); PubMed Central PMCID: PMC3535174.
51. Endres L, Dedon PC, Begley TJ. Codon-biased translation can be regulated by wobble-base tRNA modification systems during cellular stress responses. *RNA Biol*. 2015; 12(6):603–14. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1031947> PMID: [25892531](#).
52. Ranjan N, Rodnina MV. tRNA wobble modifications and protein homeostasis. *Translation (Austin)*. 2016; 4(1):e1143076. <https://doi.org/10.1080/21690731.2016.1143076> PMID: [27335723](#); PubMed Central PMCID: PMC4909423.
53. Phizicky EM, Hopper AK. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev*. 2010; 24(17):1832–60. Epub 2010/09/03. 24/17/1832 [pii] <https://doi.org/10.1101/gad.1956510> PMID: [20810645](#).
54. Guzzi N, Ciesla M, Ngoc PCT, Lang S, Arora S, Dimitriou M, et al. Pseudouridylation of tRNA-Derived Fragments Steers Translational Control in Stem Cells. *Cell*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.008> PMID: [29628141](#).
55. Tuorto F, Liebers R, Musch T, Schaefer M, Hofmann S, Kellner S, et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2012; 19(9):900–5. Epub 2012/08/14. nsmb.2357 [pii] <https://doi.org/10.1038/nsmb.2357> PMID: [22885326](#).
56. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Saitou M. Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nat Protoc*. 2007; 2(3):739–52. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.79> PMID: [17406636](#)
57. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2012; 14(1):22–9. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002> PMID: [22166544](#)



58. Ament Z, West JA, Stanley E, Ashmore T, Roberts LD, Wright J, et al. PPAR-pan activation induces hepatic oxidative stress and lipidomic remodelling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016; 95:357–68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.033> PMID: [26654758](#)
59. Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution 1H-NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*. 2002; 15(1):37–44. <https://doi.org/10.1002/nbm.740> PMID: [11840551](#)
60. Mazzon M, Castro C, Thaa B, Liu L, Mutso M, Liu X, et al. Alphavirus-induced hyperactivation of PI3K/AKT directs pro-viral metabolic changes. *PLoS Pathog*. 2018; 14(1):e1006835. Epub 2018/01/30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006835> PMID: [29377936](#); PubMed Central PMCID: PMC5805360.
61. Heiss M, Reichle VF, Kellner S. Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS. *RNA Biol*. 2017; 14(9):1260–8. Epub 2017/05/11. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1325063> PMID: [28488916](#); PubMed Central PMCID: PMC5699550.
62. Cai WM, Chionh YH, Hia F, Gu C, Kellner S, McBee ME, et al. A Platform for Discovery and Quantification of Modified Ribonucleosides in RNA: Application to Stress-Induced Reprogramming of tRNA Modifications. *Methods Enzymol*. 2015; 560:29–71. Epub 2015/08/09. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.03.004> PMID: [26253965](#); PubMed Central PMCID: PMC4774897.
63. Borland K, Diesend J, Ito-Kureha T, Heissmeyer V, Hammann C, Buck AH, et al. Production and Application of Stable Isotope-Labeled Internal Standards for RNA Modification Analysis. *Genes (Basel)*. 2019; 10(1). Epub 2019/01/10. <https://doi.org/10.3390/genes10010026> PMID: [30621251](#); PubMed Central PMCID: PMC6356711.
64. Hauenschild R, Tserovski L, Schmid K, Thuring K, Winz ML, Sharma S, et al. The reverse transcription signature of N-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(20):9950–64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv895> PMID: [26365242](#).
65. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(W1):W90–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377> PMID: [27141961](#); PubMed Central PMCID: PMC4987924.
66. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:128. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128> PMID: [23586463](#); PubMed Central PMCID: PMC3637064.
67. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10:48. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48> PMID: [19192299](#); PubMed Central PMCID: PMC2644678.



# Sequence- and structure-specific cytosine-5 mRNA methylation by NSUN6

Tommaso Selmi<sup>1,†</sup>, Shobbir Hussain<sup>2,†</sup>, Sabine Dietmann<sup>3</sup>, Matthias Heiss<sup>4</sup>, Kayla Borland<sup>4</sup>, Sophia Flad<sup>5</sup>, Jean-Michel Carter<sup>2</sup>, Rebecca Dennison<sup>6</sup>, Ya-Lin Huang<sup>1</sup>, Stefanie Kellner<sup>4</sup>, Susanne Bornelöv<sup>7,\*</sup> and Michaela Frye<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EH, UK, <sup>2</sup>Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Claverton Down, Bath BA2 7AY, UK, <sup>3</sup>Washington University School of Medicine in St. Louis, 660 S. Euclid Ave, St. Louis, MO 63110, USA, <sup>4</sup>Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich, Butenandtstr. 5-13, Haus F, 81377 Munich, Germany, <sup>5</sup>German Cancer Research Center – Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany, <sup>6</sup>Cambridge Institute of Public Health, University of Cambridge, Forvie Site, Robinson Way, Cambridge CB2 0SR, UK and <sup>7</sup>Wellcome – MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, Puddicombe Way, Cambridge CB2 0AW, UK

Received September 22, 2020; Revised November 20, 2020; Editorial Decision November 20, 2020; Accepted November 24, 2020

## ABSTRACT

The highly abundant N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) RNA modification affects most aspects of mRNA function, yet the precise function of the rarer 5-methylcytidine (m<sup>5</sup>C) remains largely unknown. Here, we map m<sup>5</sup>C in the human transcriptome using methylation-dependent individual-nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation (miCLIP) combined with RNA bisulfite sequencing. We identify NSUN6 as a methyltransferase with strong substrate specificity towards mRNA. NSUN6 primarily targeted three prime untranslated regions (3'UTR) at the consensus sequence motif CTCCA, located in loops of hairpin structures. Knockout and rescue experiments revealed enhanced mRNA and translation levels when NSUN6-targeted mRNAs were methylated. Ribosome profiling further demonstrated that NSUN6-specific methylation correlated with translation termination. While NSUN6 was dispensable for mouse embryonic development, it was down-regulated in human tumours and high expression of NSUN6 indicated better patient outcome of certain cancer types. In summary, our study identifies NSUN6 as a methyltransferase targeting mRNA, potentially as part of a quality control mechanism involved in translation termination fidelity.

## INTRODUCTION

Over 170 known RNA modifications extensively increase the functional diversity of RNA molecules (1). Accordingly, RNA modifications emerged as an important additional regulatory layer of gene expression programs and are often required for normal development (2). Recent advances in detection technology, mostly associated with high-throughput sequencing, have revealed how RNA modifications influence many stages of RNA metabolism, and thereby effect diverse biological processes including cell fate decisions, immune responses, and tumorigenesis (3–5).

One of the best-studied modifications is N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A), the most abundant mRNA modification that controls gene expression (6). The prevalence and function of other rarer mRNA modifications such as N1-methyladenosine (m<sup>1</sup>A), N6,2'-O-dimethyladenosine (m<sup>6</sup>Am), m<sup>5</sup>C, 5-hydroxymethylcytosine (hm<sup>5</sup>C), and Pseudouridine (Ψ) are less well-characterised and often somewhat controversial (7). One of the most disputed modifications in mRNA is m<sup>5</sup>C as current conventional detection methods are associated with high background levels, making this low-abundance modification particularly challenging to define (8,9). Furthermore, the total levels of m<sup>5</sup>C in mRNA varies between tissues (10). Nevertheless, NSUN2, a m<sup>5</sup>C RNA methyltransferase mainly targeting tRNAs, has consistently been linked to mRNA methylation (11–15).

NSUN2 is one of eight evolutionary conserved m<sup>5</sup>C RNA methylases (NSUN1–7 and DNMT2) (2). Of these, NSUN2, 3, 6 and DNMT2 have all been shown to methylate

\*To whom correspondence should be addressed. Email: M.Frye@dkfz.de

Correspondence may also be addressed to Susanne Bornelöv. Email: smb208@cam.ac.uk

<sup>†</sup>The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

tRNAs, yet in a non-overlapping and site-specific manner (15–20). NSUN2 is however the only enzyme with a broader substrate-specificity, methylating the majority of expressed tRNA, other abundant non-coding RNAs and a small number of mRNAs (11–15,21).

Here, we map NSUN6-dependent m<sup>5</sup>C sites in RNAs in the human transcriptome using our recently developed miCLIP method (12,22). Unexpectedly, we find that most sites located to protein coding RNAs within the consensus sequence motif CTCCA. NSUN6-specific sites were enriched in the 3'UTR and marked translation termination. RNA bisulfite (BS) sequencing confirmed m<sup>5</sup>C sites in mRNAs that were lost in knockout cells and rescued by overexpressing the NSUN6 protein. NSUN6-targeted mRNAs were more abundant with higher translation rates. NSUN6 was dispensable for mouse embryonic development. However, NSUN6-expression levels were down-regulated in tumours when compared to normal tissues, and high NSUN6 positively correlated with patient survival rate. Together, our study shows for the first time that NSUN6 mediates site-specific deposition of m<sup>5</sup>C in mRNA, potentially as part of a novel translation quality control mechanism.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

The human embryonic stem cell (hESC) line Hues9 (H9) was obtained from the Wicell Research Institute (Madison, WI) and maintained in Essential 8 media (Thermo Fisher Scientific) on hESC-Qualified Matrigel (Corning) coated plates. Media was refreshed daily and the cultures were dissociated in clumps every 4 days using 0.5 mM EDTA in PBS. In the embryoid bodies experiments, 70% confluent hESC were dissociated in clumps and seeded on ultra-low attachment well plates (Corning) maintaining a 1:1 dilution factor. After plating, hESC were cultured in Essential 6 media (Thermo Fisher Scientific) plus 10  $\mu$ M rock-inhibitor (Y-27632) (Stem Cell Technologies Canada) for the first 24 h and for further 7 days in Essential 6 media (Thermo Fisher Scientific).

HEK293 (HEK) (ATCC) and MBA-MD-231 (ATCC) cells were grown in DMEM Media (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1mM Glutamax (Thermo Fisher Scientific), 10% heat inactivated FBS (Thermo Fisher Scientific). All cells were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### Migration assays

NSUN6 was knocked down in MDA-MB-231 using NSUN6 siRNA pools (siTOOLSBIOTEC) via RNAimax transfection reagent (Thermo Fisher Scientific), according to manufacturer's instructions. Twenty-four hours post transfection, NSUN6 and control siRNA treated cells were cultured for another 24 h in DMEM containing 1% heat inactivated FBS. On the day of the experiment, 5000 starved cells were plated onto a Transwell insert (Costar, 8 $\mu$ m pores) in DMEM containing 1% heat inactivated FBS. The plate well was filled with DMEM containing 10% FBS to promote migration. After 24 h, Transwell inserts were fixed and stained with a solution of Crystal Violet in 80% Methanol for 10 min, followed by three washes in PBS. Non-migratory

cells, on the upper side of the membrane, were removed by gently swiping with cotton swabs. Cells that migrated to the lower side of the Transwell were quantified by microscopy and counted using ImageJ software. At least three representative images were taken per Transwell filter. Each sample was tested in quadruplicates

### Generation of NSUN6 knockout, rescue and overexpressing lines

NSUN6 knockout H9 cells were generated either by using homology directed recombination (HDR) or by inserting random Indels in response of double strand breaks (NHEJ). For HDR, we targeted exon 2 of NSUN6 with wild type Cas9 (pSpCas9(BB)2A-GFP) plus the recombination vector pD07 (Genecopoeia) carrying the selection genes puromycin and eGFP under control of EIF1a promoter and with homology arms on Introns 1 and 2. gRNAs were designed using the gRNA design software from the Feng Zhang lab at MIT (Exon2 gRNA1: ATT TTT CAC ATG TTG TAC TG AGG, Exon2 gRNA2: GAT GAA CTT CAG AAG GTT TG TGG). Four days after nucleofection with the AMAXA Nucleofector Kit (Lonza), we applied puromycin selection until we observed the appearance of green colonies, which were screened for integration of the recombination cassette and for the presence of NSUN6 exon 2. For NHEJ, we targeted the exon 9 of NSUN6 with wild type Cas9 (pSpCas9(BB)2A-GFP) (Exon 9 gRNA: ATC CAG AAG AAT TCG GTC AA AGG), 3 days after nucleofection, the targeted cells were sorted and replated at low density in E8 conditioned media. We then screened by Sanger Sequencing the grown colonies for Indels in NSUN6 exon 9. For generating NSUN6 overexpressing H9, NSUN6 CDS was PCR amplified from the TrueORF pCMV-Entry vector (Origene) and cloned via Gibson assembly (NEB) into the destination piggybac vector pBPCAG-cHA-IN (kindly provided by Austin Smith). This vector and the piggy bac transposase were then nucleofected into H9 using the AMAXA nucleofector kit (Lonza). Puromycin selection started 4 days following nucleofection and the surviving clones were screened by qPCR and Western Blot for NSUN6 expression. The NSUN6 knockout HEK293 cells were generated employing a similar NHEJ-based methodology, using the guide RNA sequence: CTG ATG ACA TAC TTC AGT TC. The same overexpression strategy used in H9 was also adopted to rescue NSUN6 expression in knockout HEK293 cells.

### Luciferase reporter assay

NSUN6 knockout and overexpressing HEK cells were seeded in a 24-well plate and after 24 h transfected with either the ANGEL1-3'UTR-luciferase vector (GeneCopoeia, HmiT006021-MT05) or the control-luciferase vector (GeneCopoeia, CmiT000001-MT05) using Lipofectamine2000 according to the manufacturer's instruction (Thermo Fisher Scientific). After 48 h, the medium was collected and the luciferase assay was performed with the Secretate-Pair Dual Luminescence Assay Kit according to the protocol (Genecopoeia). To quantify the reporter activity, we first normalized for transfection efficiency using secreted Alkaline Phosphatase (SEAP), which



is encoded on the same plasmid. Second, we measured the relative luciferase activity from the reporter containing the *Angell* 3' UTR sequence compared to the reporter without the 3' UTR (CmiT000001-MT05).

### Measuring global protein synthesis with OP-puromycin

FaDu cells were reverse transfected with a siPOOL designed against NSUN6 or a scrambled control siPOOL (siTOOLS Biotech). After 48 or 72 h, cells were treated with OP-puromycin for an hour. Afterwards, the cells were collected, fixed and permeabilized. Using Click-it chemistry (Thermo Fisher Scientific), the OP-puromycin containing peptides were stained with Alexa Fluor 647 and analysed on a FACSCanto Cell Analyzer (BD Biosciences). Cycloheximide treated cells were used as a control.

### Mass spectrometry

NSUN2, NSUN6 and DNMT2 were depleted by transfecting the corresponding siRNA Pools or a Negative Control siRNA pool (siTOOLS BIOTECH). The transfections were carried out using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Thermo Fisher Scientific) in six-well plates, according to manufacturer's instructions. The siRNAs were designed to target the transcripts coding for NSUN2 (NCBI Gene ID: 54888), NSUN6 (NCBI Gene ID: 221078) and DNMT2 (NCBI Gene ID: 1787). For sample collection, cells were directly lysed in Trizol (ThermoFisher Scientific) and total RNA was extracted according to the manufacturer's instruction. mRNA was purified in HEK wild-type as well as NSUN6 knockout and rescued cells using DYNAL Dynabeads mRNA purification kit (ThermoFisher Scientific) using half the beads and reagents recommended by the manufacturer. The resulting poly A enriched RNA was further purified with RiboMinus Eukaryote kit v2 (ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's instruction followed by ammonium acetate precipitation. Mass spectrometry to quantify m<sup>5</sup>C was performed as described previously (10,23).

### Generation of the *Nsun6* knockout mice

All mice were housed in the Wellcome Trust-Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute Animal Unit. All mouse husbandry and experiments were carried out according to the local ethics committee under the terms of a UK Home Office license P36B3A804 and PPL70/7822.

Two embryonic stem cell lines containing a knockout first allele (with conditional potential) were obtained from EUMMCR (*Nsun6*<sup>tm1a(EUCOMM)Hmgu</sup>). Mice homozygote for the targeted trap allele was used to analyse *Nsun6* total knockout. Genotyping primers were: *Nsun6*-forward (AAT CCA GCA TTC CTG TTG TTC AGC), *LoxR* (TGA ACT GAT GGC GAG CTC AGA CC), *Nsun6*-5'arm-2 (ACA GTG AGT CAG GTG AGG TGT GCC), and *Nsun6*-rev (CAC AAT GAG ACA GCA CCC AG). The LacZ-neo cassette was used as reporter for *Nsun6* RNA expression in wild-type and *Nsun6* total knockout mice. LacZ staining on whole mounts and sections of embryos was performed as described previously (24).

### RT-qPCR and western blotting

Total RNA was extracted using TRIZOL (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer instructions. Reverse transcription was performed using SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and random primers (Promega). Quantitative PCR were run using TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific) for eukaryotic 18S rRNA (X03205.1), MARCKSL1 (Hs00702769.s1), TRAF7 (Hs00260228.m1), ANGEL1 (Hs00380490.m1), CALM3 (Hs00968732.g1), BAG6 (Hs00190383.m1), CUX1 (Hs00738851.m1), TRIMM50 (Hs01390531.m1), BUB3 (Hs00945687.m1), EEF (Hs00265885.g1), MACF1 (Hs00201468.m1), DLX5 (Hs01573641.mH), DNMT3B (Hs00171876.m1), FOXD3 (Hs00255287.s1), GATA6 (Hs00232018.m1), HOXA1 (Hs00939046.m1), NANOG (Hs02387400.g1), POU5F1 (Hs03005111.g1), TDGF1 (Hs02339497.g1).

For protein isolation, cells were first rinsed with PBS and lysed in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate). RIPA was supplemented with cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablets (11836170001, Roche). Cells were collected using a cell scraper and the lysates were centrifuged for 15 min at maximum speed in a pre-cooled centrifuge at 4°C, and their supernatant collected and kept on ice. Cell protein lysates were mixed with NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (NP0007; Invitrogen) and run on polyacrylamide gels. Proteins were transferred to a nitrocellulose or PVDF membrane (GE Healthcare). Membranes were blocked for a minimum of 1 h at room temperature in 5% (w/v) non-fat milk or 5% (w/v) BSA (A4503–50G; Sigma Aldrich) in TBS-T (1× TBS and 0.1% Tween-20) and then incubated with primary antibody in blocking solution overnight at 4°C. Each membrane was washed three times for 10 min in TBS-T prior to incubation with the appropriate Horseradish peroxidase (HRP)-labeled secondary antibody (1:10 000) in TBS-T at room temperature for 1 h. After washing, the antibodies were detected by using the Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232; GE Healthcare). The primary antibody was NSUN6 (1:500, 17240-1-AP, Proteintech). Anti-γ-Tubulin (T6557; Sigma Aldrich), Anti-HSP90 (sc-13119; Santa-Cruz) or Ponceau staining served as loading controls.

### miCLIP

Full-length cDNA constructs for NSUN6 in the pCMV6-Entry-Myc vector were obtained from OriGene. Site-directed mutagenesis to generate the miCLIP-mutants was performed using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit from Agilent as per the manufacturer's instructions. To generate the NSUN6 miCLIP mutant, cysteine 326 was mutated to alanine using the following primers: (forward) GAA TTC TTC TGG ATG CAC CCG CTA GTG GAA TGG GAC AGA GAC; (reverse) GTC TCT GTC CCA TTC CAC TAG CGG GTG CAT CCA GAA GAA TTC. HEK293 cells were transfected with either NSUN6 wild-type and the miCLIP-mutant construct using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) and harvested 24 h later.

The harvested cells were lysed in lysis buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate. Lysates were then treated with high concentration of DNase and low concentration of RNaseI to partially fragment RNAs. Lysates were cleared by centrifugation at 13 000 rpm for 15 min at 40°C and then incubated with Protein G Dynabeads (Life Technologies) in the presence of an anti-Myc antibody (9E10, Sigma). Following stringent washing, 3' end dephosphorylation was performed with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) before addition of a pre-adenylated linker using RNA ligase (New England Biolabs). 5' end labelling was then performed using T4 PNK and <sup>32</sup>P-ATP before protein-RNA complexes were eluted and run on denaturing gels. Nitrocellulose transfer was performed, and the radioactive signal was used to dissect nitrocellulose pieces that contained NSUN6-partially digested RNA complexes. RNA was recovered by incubating the nitrocellulose pieces in a buffer containing Proteinase K and 3.5 M urea. Next, reverse transcription was performed using oligonucleotides containing two inversely oriented adaptor regions separated by a BamHI restriction site. cDNAs were size-purified on TBE-urea gels before being circularized by CircLigase II (Epicentre). Circularised cDNAs were then annealed to an oligonucleotide complementary to the BamHI site and then BamHI digested. Linearized cDNAs were then PCR-amplified using primers complementary to the adaptor regions using 25 cycles of PCR. Libraries were then subjected to high-throughput sequencing using the Illumina HiSeq 2000 platform.

### RNA bisulfite conversion and sequencing

Total RNA from H9 wild-type (WT), knockout (KO), over-expression (OEX) and HEK293 WT, KO and NSUN6 rescue (RES) cells was first extracted using Trizol (Thermo Fisher Scientific) and subsequently treated with DNaseI (Ambion) and RiboZero (Illumina) to remove contaminating DNA and ribosomal RNAs. The remaining RNA was then converted as previously described (15,25). Briefly, 10 µg of RNA was resuspended in 10 µl of RNase free water and mixed with sodium bisulfite pH 5.0 (42.5 µl) and DNA protection buffer (17.5 µl) (EpiTect Bisulfite Kit, Qiagen). The deamination reaction was then carried out by incubating in a thermal cycler for four cycles of 5 min at 70°C followed by 1 h at 60°C and then desalted with Micro Bio-spin 6 chromatography columns (Bio-Rad). RNA was desulphonated by adding an equal volume of 1 M Tris (pH 9.0) to the reaction mixture for 1 h at 37°C, followed by ethanol precipitation. The bisulfite-converted RNA quality and concentration were assessed on a Bioanalyzer 2100 RNA nano-chip (Agilent). About 120 ng of bisulfite-converted RNA were used to generate Bisulfite-seq libraries using the TruSeq Small RNA preparation kit (Illumina). Before library preparation, the fragmented RNA was end-repaired with T4 PNK and Spermidine (New England Biolabs). The size selection step was omitted, as the bisulfite-converted RNA was sufficiently fragmented by the previous conversion reaction. First the Illumina RNA adapters were then ligated, reverse-transcribed at 50°C for 1 h with SuperScript III and 1 mM of each dNTP (Super-

Script III cDNA synthesis kit, Invitrogen) followed by 18-cycle PCR amplification.

### RNA sequencing and ribosome profiling

Total RNA extraction, ribosome profiling (Ribo-seq) and libraries for H9 NSUN6 WT and KO cells (at least four replicates each) were performed as described before (26–28). The samples were multiplexed and sequenced on the HiSeq 4000 platform (Illumina).

### Processing, mapping and quantification of RNA-seq and Ribo-seq reads

The H9 RNA-seq data was sequenced as paired-end 2 × 150 nt and the HEK RNA-seq data was sequenced as single-end 50 nt. All Ribo-seq data was single-end 50 nt. To process the data, Trim galore! (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) with parameters ‘-stringency 6 -e 0.1’ and ‘-paired’ for the paired-end data was first used to remove Illumina adapters and to exclude trimmed reads shorter than 20 nt. Alignment was done using Tophat2 (v2.1.0) using an index with known transcripts (Gencode v23) as guidance and with novel splice junctions permitted. The RNA-seq reads were aligned directly to the reference genome (hg38). Ribo-seq reads were first aligned to a set of known rRNA and tRNAs (downloaded from the UCSC RepeatMasker tracks), followed by alignment of all unmapped reads to the reference genome. Multi-mapping read were excluded. FeatureCounts was used to quantify the number of reads per gene using the Gencode v23 gene models. Only reads aligning to the sense strand of the gene, represented either by its exons (RNA-seq) or its coding sequence (Ribo-seq), and with mapping quality at least 20 were counted. For the paired-end RNA-seq the additional flags ‘-p -B -C’ was specified to exclude chimeric reads and/or reads mapping with only one end.

### RNA-seq and Ribo-seq differential expression analyses

Differential expression analysis was done using the R Bioconductor edgeR package. Genes with mean expression below 1 count per million mapped reads were considered non-expressed and excluded from the analysis. The R Bioconductor cqn packages (29) was used for conditional quantile normalization to calculate offsets correcting for gene lengths (from featureCounts) and GC content (from biomaRt). The offsets were passed to the edgeR DGEList object, followed by a likelihood ratio test using glmFit and glmLRT. Five knockout cell lines (four H9 and two HEK) were compared to their respective control cell line (two H9 and one HEK). Each cell line was sequenced in four replicates.

Differential translation efficiency (TE) analysis was done with DESeq2 due to its ability to report the standard error (SE) associated with each log<sub>2</sub> fold change (log<sub>2</sub> FC). First, Nsun6 knockout was compared with control using the RNA-seq or Ribo-seq data separately to estimate log<sub>2</sub>FCs and SEs for each gene and assay. Translational efficiency of a gene can be defined as the difference between log<sub>2</sub>FC<sub>Ribo</sub> and log<sub>2</sub>FC<sub>RNA</sub> and the associated *P*-value is the probability that this difference is zero. Assuming that the log<sub>2</sub> FCs



follow a normal distribution, the  $T$ -statistic was calculated as  $T = \frac{|\log_2 FC_{\text{Ribo}} - \log_2 FC_{\text{RNA}}|}{\sqrt{(SE_{\text{Ribo}}^2 + SE_{\text{RNA}}^2)}}$ . The resulting two-tailed  $P$ -values were further corrected for multiple testing by false discovery rate correction using the  $R$  function  $P.adjust$ .

### Determining read periodicity and codon enrichments using Ribo-seq

Codon usage in the Ribo-seq data was calculated following (28). The analysis was focused on reads of length 27–29, which were showing the strongest periodicity. Position 12–14 were determined to correspond to the codon at the P-site.

The bam file for each sample with uniquely aligned reads was converted to bed format. Bedtools intersect was used to select reads with at least 50% overlap to Gencode-annotated coding sequences. Next, the reading frame of the 5' end of each read was determined using the frame information in the Gencode annotation. If the frame did not agree with the expected reading frame for that read length, the read was discarded. Then, nucleotide positions 1–27 were extracted from each read as nine codons, numbered as codon position –5 to +3, where 0 corresponded to the A-site. As expected, position –4 to –2 and +1 to +3 correlated well to the genome-wide distribution of codons in the human translome, whereas counts from the predicted P-site and A-site did not.

The number of codon occurrences were counted separately for each ribosome-protected codon position and converted into a fraction of the total number of codons. Normalized codon counts were obtained by dividing the codon fraction at a specific position by the mean fraction across all nine positions.

### Processing and mapping of miCLIP reads

In order to reduce amplification bias, the primers used for reverse transcription during miCLIP experiments were designed to include a 6-nucleotide random barcode at positions 1–3 and 8–10 to enable tracing of individual cDNAs. Reads were de-multiplexed using the experimental barcode at positions 4–7, and reads with identical random barcodes, representing PCR products, were filtered. The number of different random barcodes for each unique read, which represented cDNA counts, was stored for further analysis. Barcodes were trimmed from the 5' end, and the adapter sequence 'AGATCGGAAGAGCGGTTCAG' from the 3' end of the reads with *cutadapt* (<https://code.google.com/p/cutadapt>; options: '-O 4 -e 0.06'), and only reads with a minimal length of 18 nt were retained.

Trimmed miCLIP reads were mapped to the human reference genome (UCSC GRCh37/hg19) by using *bowtie* (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) with parameters '-ml -v1 -best -strata' to select uniquely mapping reads allowing one mismatch. Methylation sites were thus inferred from miCLIP read truncation positions by assigning the read counts to the closest cytosine within  $\pm 2$  nt of the truncation site. Pooled read counts per cytosine were normalized per million uniquely mapping reads (RPM). If not stated otherwise, only high-confidence methylation sites with normalized read counts > 50 RPM in at least two out of three replicates were selected for down-stream analyses.

### Quantifying coding sequence annotation and Ribo/RNA-seq reads at miCLIP sites

To visualize coding sequence across miCLIP sites, annotated coding sequences (Gencode V28) were merged using bedtools merge and was then converted to bigWig format using the UCSC bedGraphToBigWig tool. This was done separately for both strands. Furthermore, to allow visualization of RNA-seq and Ribo-seq read coverage at miCLIP sites, deepTools bamCoverage was used to convert the aligned reads to bigWig format. Each strand was quantified separately, and a blacklist file containing all rRNA, tRNA, snoRNA, snRNA and miRNA regions was provided. The bin size was set to 1 and an offset of 12 was used to only consider a single nucleotide corresponding to the 'P' site predicted from each read.

Next, deepTools computeMatrix in 'reference-point' mode with parameters -b 1500 -a 1500 -missingDataAsZero was used to extract annotation or reads coverage across miCLIP sites. The Ribo-seq read coverage was used to classify the miCLIP sites as start, middle and end of translation, based on the difference between the number of covered bases up-stream and down-stream of the miCLIP site. The standard error (SE) of the differences was calculated and a threshold of  $\pm 1.96SE$  was used to defined 'start' and 'end' of translation. The remaining sites were classified as 'middle'. Custom R scripts were used to combine sites on both strands and to visualize it as a heatmap or a profile plot. The scripts related to this analysis are available at <https://github.com/susbo/Selmi-et-al-scripts>.

### Calculating overlap between miCLIP sites and differentially expressed genes

Out of the 15,885 genes expressed in HEK, 1,853 genes were defined as down-regulated and 2008 as up-regulated at  $P_{\text{adj}} < 0.05$  and  $\text{abs}(\log_2 FC) > 0.5$  in both HEK knock-out clones. Next annovar (30) was used to identify the closest genes for all 252,135 putative miCLIP sites. The set of genes with exonic miCLIP sites (at 0, 0.5, 1, 3, 5, 10 or 50 RPM) was compared with genes without exonic miCLIP sites. The relative enrichment or depletion of gene down- or up-regulation was calculated as an odds ratio with a 95% confidence interval using Fisher's exact test.

### Processing and mapping of BS-seq reads

The BS-seq was processed as described previously (21). First, Trim Galore! (v0.4.0) with parameters '-stringency 3 -e 0.2 -a TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGA' was used to remove sequencing adapters and exclude reads shorter than 20 nucleotides. Next, alignment to the hg38 reference genome was done using Bismark (v0.14.4) with parameters '-n 2 -l 50 -un -ambiguous -bowtie1 -chunkmbs 2048', to allow for up to two mismatches and to save unaligned and ambiguously mapping reads separately. Seqtk with parameters '-e 3' was used to remove the last three bases (a potential tRNA 'CCA' tail) from the unaligned and ambiguous reads followed by a second alignment attempt using Bismark. Finally, ngsutils (v0.5.9) in the 'junction' mode was used to extract splice junctions from known genes (Gencode

v28) and unaligned reads from the second alignment were aligned to the junctions using Bismark. Reads aligned to the junctions were converted back to genomic coordinates using bamutil (<https://github.com/statgen/bamUtil>) in 'convertregion' mode. 'N' in the cigar string was replaced with 'D' for compatibility with bismark\_methylation\_extractor.

Samtools merge was used to combine aligned reads from all three alignment attempts. Reads with  $>1/3$  methylated cytosines were discarded as they are likely artifacts from conversion-resistant regions. The bismark\_methylation\_extractor with the '-bedGraph -counts -CX\_context' options was used to extract methylated cytosines.

For comparisons with methylation sites in Huang *et al.* (11) we used the published methylation sites from their Supplementary Table S4. The liftover tools was used to convert hg19 coordinates to hg38 coordinates. However, to visualize the methylation levels in those samples, we re-aligned those datasets to the hg38 genome using our pipeline.

To detect tRNA methylation, we downloaded high-confidence tRNA annotations from GtRNAdb (<http://gtRNAdb.ucsc.edu>, hg38). Some tRNAs have multiple gene copies for the same transcript sequence. We selected the first gene copy (identified by a '1' in the fifth field of its name, e.g., 'tRNA-Ala-AGC-9-1'), reducing the number of tRNA copies from 432 to 261. Next, introns were removed, the 'CCA' tail added, and two flanking 'N' on each site of the transcript was added to avoid Bismark warnings due to missing sequence context. In order not to exclude multi-mapping reads during the alignment, a genome index was prepared for each individual tRNA transcript, followed by alignment of all reads to all tRNA indices using Bismark with the parameters described above.

All valid tRNA alignments for each read were extracted. If a read mapped to multiple transcripts, one alignment among alignments with the fewest mismatches was selected at random and the others alignments were discarded. This ensures that no read is counted multiple times. Reads with  $>1/3$  methylated cytosines were discarded as they are likely artifacts from conversion-resistant regions. Finally, the bismark\_methylation\_extractor with the '-bedGraph -counts -CX\_context' options was used to extract cytosine methylation levels.

### Quantification of methylation at miCLIP sites and known methylation sites

Methylation signal was quantified across protein-coding miCLIP sites and across the 13 published lists of methylation sites from Huang *et al.* (11) representing HEK293, HeLa (control and NSUN2 knockout) and seven tissues. Genomic coordinates were converted to hg38 using the liftover tool, and the genomic context ( $\pm 10$  nucleotides) of the site was extracted. For each set of sites, we analysed sites with the CTC[CT]A motif and sites without the motif separately. To reduce the noise from the miCLIP experiment, miCLIP sites located next to a motif were shifted to the motif and duplicate sites were removed. For each cytosine within 10 nucleotides from the methylation site, the total number of reads that either supported or did not support methylation were calculated. To avoid having very high-covered

sites dominating the analysis, sites with more than 5 reads were normalized to 5 reads before the reads were summarized. Methylation level was calculated as the number of normalized reads supporting methylation, divided by the total number of normalized reads.

### Analysis related to translation readthrough

To determine if miCLIP sites in 3' UTRs of protein coding genes ( $n = 522$ ) could be associated to translation readthrough, we determined the frequency of in-frame stop codons between the nearest up-stream annotated stop codon and the 3' UTR miCLIP site. As a control, we used a region of equal size immediately down-stream of the miCLIP site.

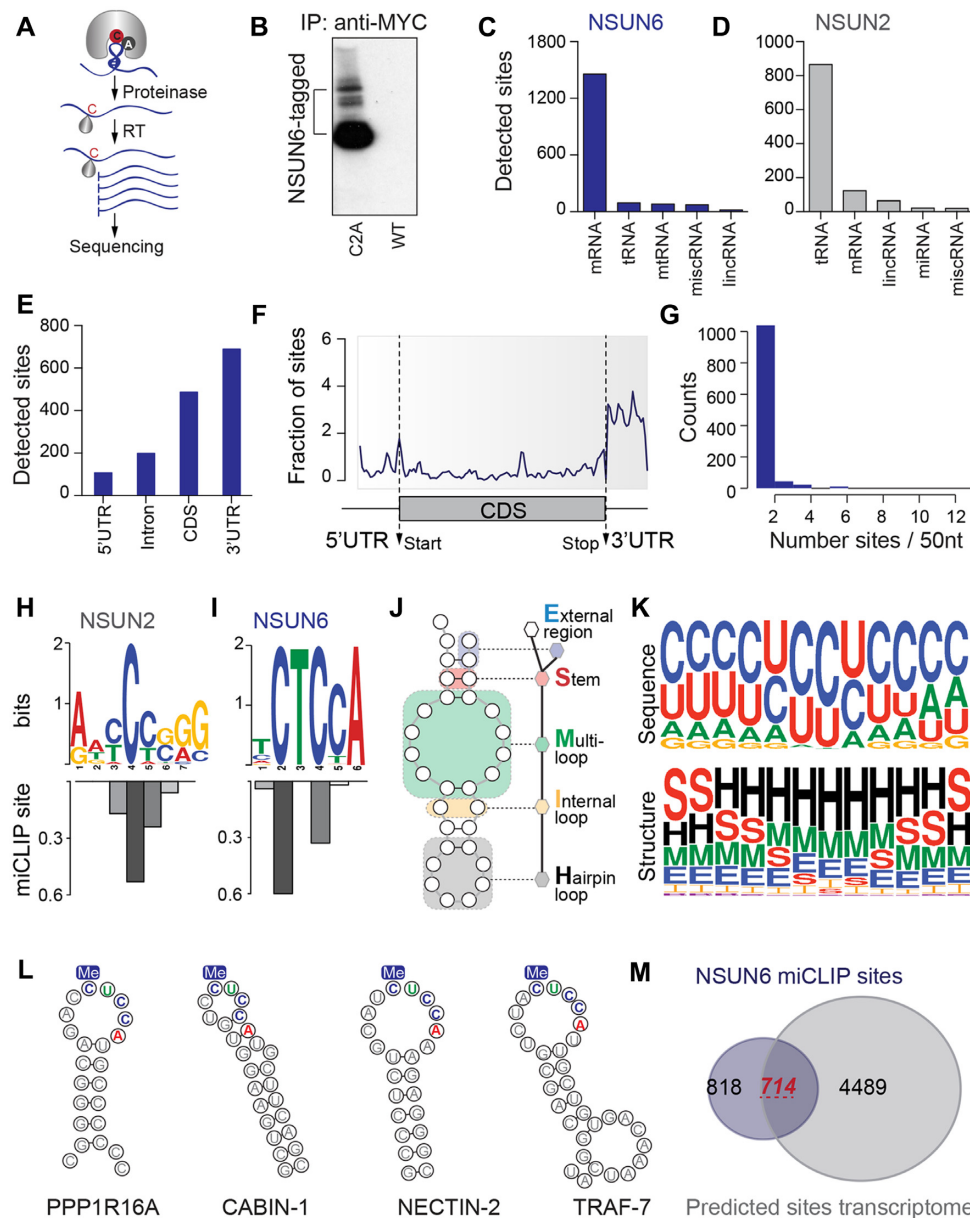
Translational readthrough is associated with usage or rare stop codons and unfavoured stop codon contexts, defined as the base immediately down-stream of the stop codon. The stop codon context for all annotated stop codons (Gencode V23) was retrieved using samtools faidx. Genes with multiple annotated stop codons were represented as a fraction of stop codons with sum 1. The overall stop codon context was calculated for all protein-coding genes or those that were identified as miCLIP targets, respectively.

## RESULTS

### miCLIP reveals enzymatic targets of NSUN6

RNA:m<sup>5</sup>C methyltransferases contain a catalytic domain with a common structural core and the S-Adenosyl methionine-binding site (Supplementary Figure S1A). Two conserved cysteines, both located within the methyltransferases active site, are required for completion of the catalytic process (31). Methylation is initiated when cysteine (C<sub>1</sub>) forms a covalent bond with the cytosine pyrimidine ring (32). The second conserved cysteine (C<sub>2</sub>) is required to then break the covalent adduct and to release the methylated RNA (Supplementary Figure S1B). Mutating C<sub>2</sub> to alanine results in the irreversible formation of an enzyme-RNA crosslinked complex precisely at the methylated cytosine (Supplementary Figure S1C) (31,33,34). The cross-linked site can then be directly identified without further fixation steps during the immunoprecipitation protocol, omitting unspecific RNA-protein events (12,22). Because the crosslinking occurs during the methylation reaction, we termed the method methylation iCLIP (miCLIP) (12).

We previously utilized miCLIP to identify NSUN2 and NSUN3 methylated nucleosides transcriptome-wide (Figure 1A; Supplementary Figure S1A-C) (12,17). Here, we analysed a third related m<sup>5</sup>C RNA methyltransferase, NSUN6. We sequenced all RNAs crosslinked to the mutated NSUN6 protein (Figure 1B) and found that the majority of miCLIP sites located to mRNAs (Figure 1C; Supplementary Table S1). In contrast to NSUN6, NSUN2-specific miCLIP sites mainly occurred in tRNAs (Figure 1D; Supplementary Table S2) (12). NSUN2 and NSUN6 shared less than 4% of identified miCLIP targets (Supplementary Figure S1D), and the vast majority of shared sites in mRNAs located to non-coding RNAs or untranslated regions (Sup-



**Figure 1.** NSUN6 miCLIP reveals consensus motif in targeted RNA. (A) Schematic overview of the miCLIP method. (B) Polyacrylamide gel showing NSUN6-tagged proteins and released RNA after RNase treatment, which was isolated and sequenced. C2A: construct carrying the point mutations C→A; WT: wild-type construct. (C, D) Number of NSUN6 (C) and NSUN2 (D) miCLIP sites in the indicated RNAs. (E) Number of NSUN6 miCLIP sites in protein coding RNAs. (F) Distribution of NSUN6 miCLIP sites along mRNA. (G) Number of detected NSUN6 miCLIP sites within 50 nucleotides windows in a total of 1279 RNAs. (H, I) Binding motifs (upper panels) of NSUN2 (H) and NSUN6 (I) and frequency of miCLIP sites at the respective position (lower panels). (J) Illustration of structural motifs analysed by GraphProt. (K) Identified sequence (upper panel) and structural motif (lower panel) of NSUN6-targeted sites. (L) Examples of hairpin loop structures in NSUN6-targeted mRNAs. Me: methylation. (M) Overlap of predicted (grey) and observed (blue) miCLIP sites containing the sequence structure motif in the HEK transcriptome.

plementary Figure S1E). Thus, NSUN6 has a distinct substrate specificity, different from NSUN2.

### NSUN6 targets 3' UTRs in a sequence- and structure-specific manner

We previously identified that a small number of NSUN2-specific miCLIP sites in mRNAs which mostly occurred in introns of nuclear-encoded genes (Supplementary Figure S1F) (12). In contrast, NSUN6-mediated methylation oc-

curred mainly in the 3'UTR (Figure 1E, F). The advantage of miCLIP over other RNA immunoprecipitation methods is the covalent cross-link of the enzyme to the cytosine undergoing methylation, allowing the detection of the enzymatic reaction at nucleotide-resolution (12,22). Accordingly, we found that NSUN6-specific target sites predominantly occurred as single sites (Figure 1G).

Only NSUN6-targeted sites occurred in a sequence-specific manner, and the consensus sequence motif was present in the vast majority (80%) of all targeted sites (Fig-



ure 1H, I; Supplementary Figure S1G). Since RNA secondary structures can modulate protein binding (35), we asked whether local RNA structure influenced NSUN6 targeting. We determined the sequence- and structure-specific preferences of NSUN6 miCLIP sites using GraphProt (Figure 1J) (36), and found that the methylated sites occurred preferentially centred within hairpin loops (H) of stem loop structures (Figure 1K, L). The fraction of predicted structural motifs was independent of the miCLIP threshold (10–50 RPM) (Supplementary Figure S1H). Our data is consistent with a previous study showing that NSUN2-independent methylation sites in mRNAs located to stem loop structures (11).

Finally, we asked what fraction of mRNAs contained a NSUN6-targeted sequence-structure element (Supplementary Figure S1I). First, we calculated that the minimum free energy of NSUN6-targeted RNA sequences to form a stem loop was  $-5$  kcal/mol (Supplementary Figure S1J), and 47% of all miCLIP sites formed a stem loop under this condition (Supplementary Figure S1J). Then, we compared the predicted with the observed number of NSUN6-targeted sites in the transcriptome, and found that  $\sim 14\%$  of all predicted sites in mRNAs were also targeted by NSUN6 (Figure 1M).

In conclusion, mRNA targeting by NSUN6 is based on a defined sequence-structure element in mRNAs.

### RNA bisulfite sequencing confirms NSUN6-specific methylation and consensus motif

The miCLIP method relies on over-expressing the mutated protein (37). To confirm endogenous NSUN6-specific methylation sites, we performed RNA bisulfite (BS) sequencing (BS-seq) (25,38). BS-seq on mRNAs remains challenging due to high RNA degradation during the protocol resulting in low mRNA coverage (39). To increase the confidence in all discovered sites, we used two independent cell lines, the human embryonic cell lines Hues9 (H9) and HEK293 (HEK). As negative controls, we generated at least two independent knockout clones via CRISPR/Cas9 genome editing for each cell line (Supplementary Figure S2A). Furthermore, we over-expressed NSUN6 in two independent H9 clones, and rescued two HEK knockout clones by stably over-expressing the NSUN6 construct (Supplementary Figure S2A). At least four replicates from each condition were subjected to the BS conversion protocol, generating a total of 68 RNA BS-seq datasets (Supplementary Figure S2A). For the analyses of the RNA BS-seq data we used our established pipeline (Figure 2A; Supplementary Table S3) (<https://github.com/susbo/trans-bsseq>) (21).

After mapping the reads (Figure 2B), all technical replicates were pooled to achieve the highest number of reads per cytosine in each condition. In summary, we analysed the following conditions: (i) NSUN6 knockout (KO) cells ( $n = 28$ ), (ii) wild-type (WT) cells with endogenous expression of NSUN6 ( $n = 24$ ), (iii) NSUN6 rescued (RES) cells ( $n = 8$ ) and (iv) NSUN6 over-expressing (OEX) cells ( $n = 8$ ) (Supplementary Figure S2B–E).

Next, we used the BS-seq data to evaluate the miCLIP sites, focusing on predicted sites with the sequence motif and located in protein-coding genes. As expected, the over-

all methylation and mRNA read coverage was often low (Supplementary Table S4). Nonetheless, the BS-seq datasets covered about 20% of miCLIP sites (Figure 2C; Supplementary Table S4). The total number of  $m^5C$  sites detected by both methods correlated well with expression of NSUN6 (Figure 2D). The vast majority of  $m^5C$  sites ( $\sim 80\%$ ) detected by both methods depended on NSUN6 in both cell lines (Figure 2E; Supplementary Table S4). Furthermore, the NSUN6-targeted RNAs substantially overlapped in the two cell lines (Figure 2F). Together, our BS-seq analysis reliably detected endogenous NSUN6-specific methylation sites in the transcriptome, but strongly relied on RNA abundance and methylation level at the specific cytosines.

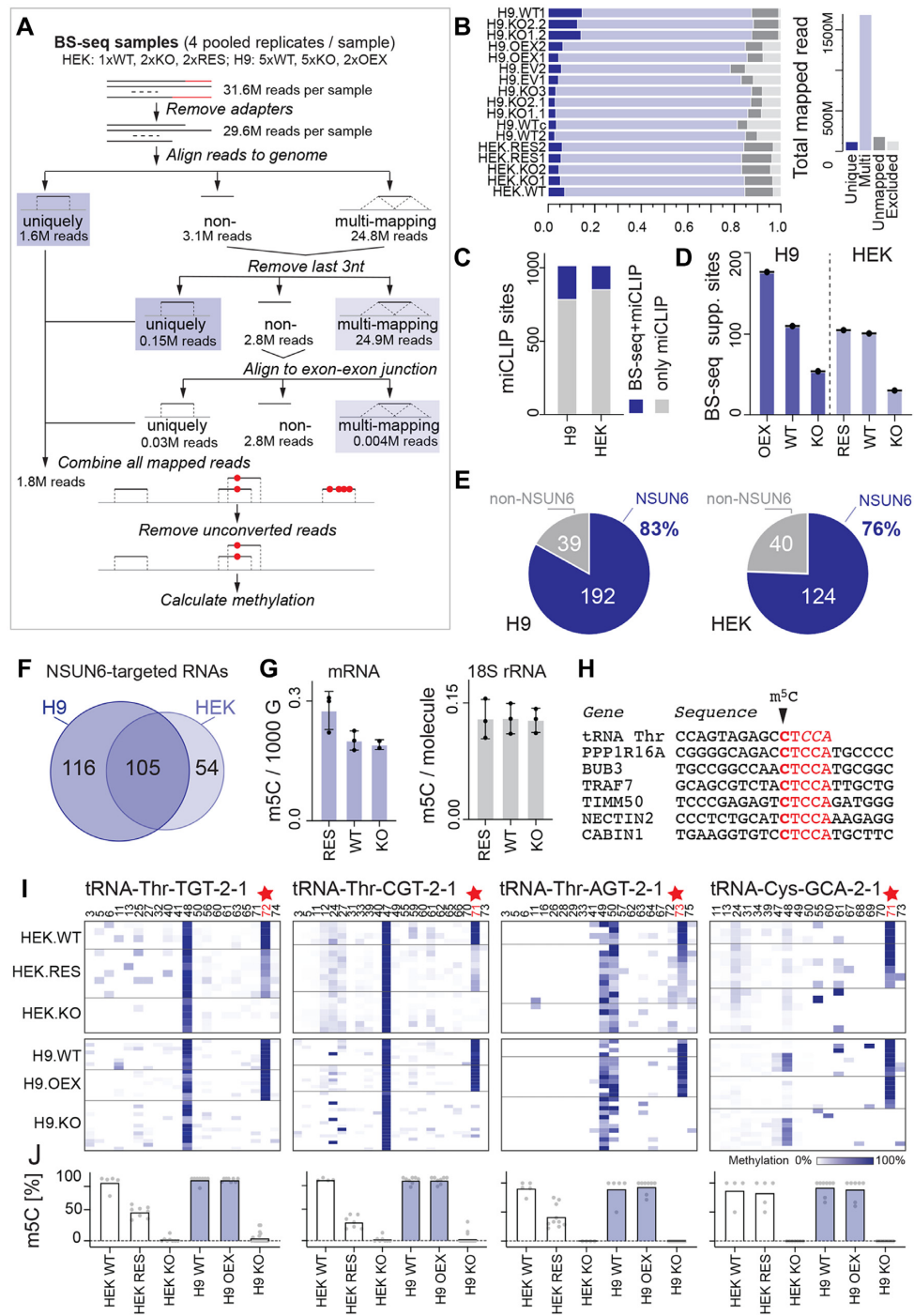
To further confirm endogenous methylation of NSUN6-specific sites we performed mass spectrometry analysis. We revealed that only deletion of NSUN6 simultaneously with NSUN2 and DNMT2 resulted in a detectable reduction of  $m^5C$  levels in tRNAs and large RNAs (Supplementary Figure S2F, G). Nevertheless,  $m^5C$  levels were highest in NSUN6-rescued HEK cells in purified mRNA, but  $m^5C$  levels in 18S rRNA was unaffected (Figure 2G). Other mRNA modifications ( $m^6A$  and  $m^7G$ ) did not consistently change (Supplementary Figure S2H). Thus, the mass spectrometry analyses confirmed that NSUN6-dependent  $m^5C$  sites in mRNA were present at low stoichiometry.

Next, we asked whether BS-seq confirmed the consensus motif CTCCA. All of the top seven RNAs identified by BS-seq containing NSUN6-mediated  $m^5C$  sites, contained the CTCCA motif (Figure 2H; Supplementary Table S5). One of these sites located to tRNA<sup>Thr</sup> (ACG), a previously known NSUN6-target (20). In this case, the motif was only present when taking CCA-editing of tRNAs into account (Figure 2H) (40). Since our analyses excluded multi-mapping reads (Figure 2A), we obtained poor read coverage over many tRNAs. tRNAs have low sequence uniqueness and therefore, they were not detected in our global analysis. To confirm that we can identify all known NSUN6-mediated methylation sites in tRNAs, we re-aligned our data to all tRNA genes. In this analysis, we allowed for multi-mappers. In addition to tRNA<sup>Thr</sup> (ACG), we confirm tRNA<sup>Thr</sup> (TGT), (CGT), (AGT) and tRNA<sup>Cys</sup> (GCA) to be specifically methylated by NSUN6 (Figure 2I, J) (20). No other NSUN6-dependent  $m^5C$  sites were found in tRNAs.

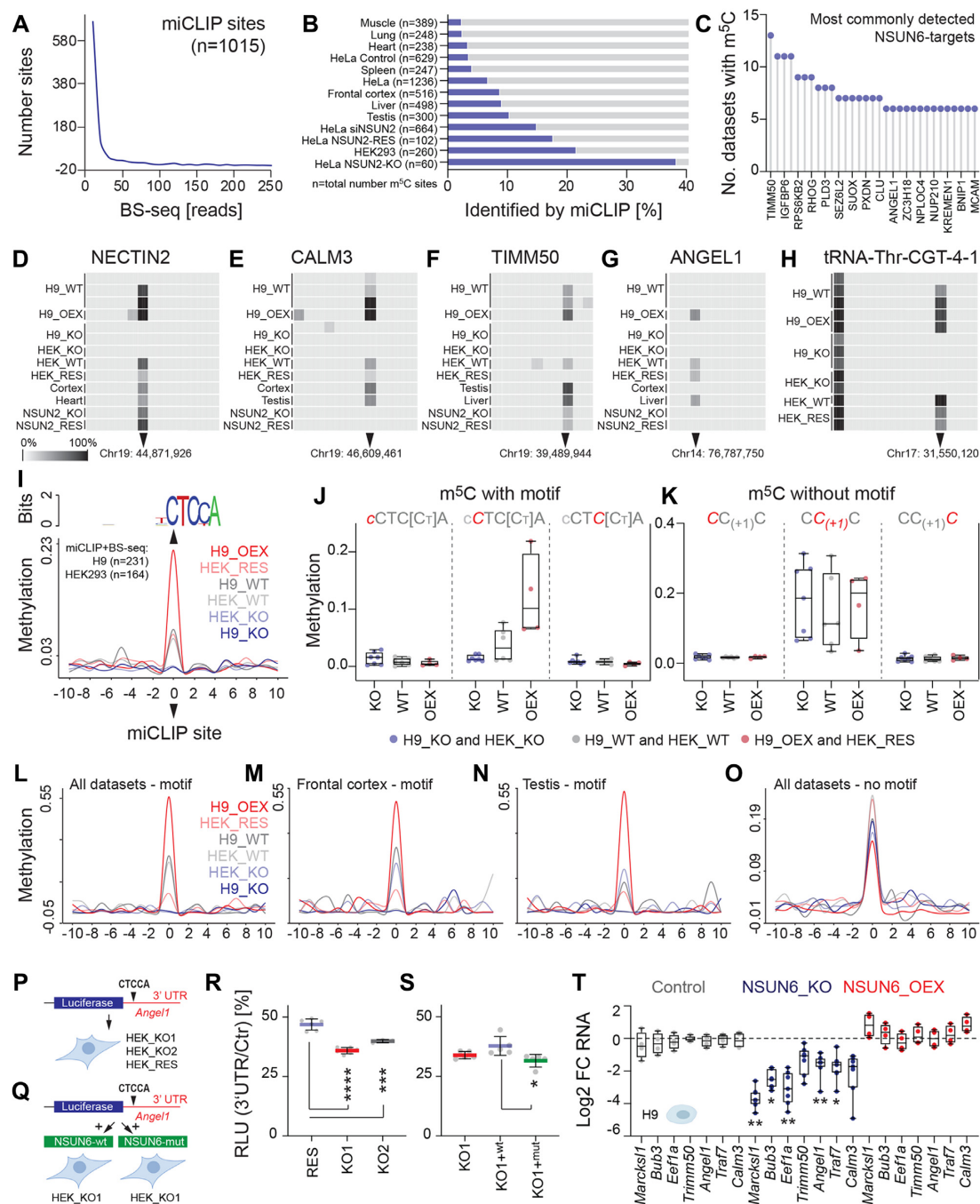
In conclusion, three independent methods identify NSUN6-dependent methylation in mRNA. However, in line with previous studies the overall number of  $m^5C$  was low and single sites having methylation levels of  $>20\%$  were extremely rare (8).

### NSUN6-specific methylation strictly depends on the consensus sequence

Since NSUN6 mainly targeted mRNAs (Figure 1C), we next focused on miCLIP sites within protein coding regions. As those miCLIP sites were covered by comparably few reads in the BS-seq data (Figure 3A), we extended our analysis by asking which NSUN6 miCLIP sites were also identified in previously published datasets (Supplementary Table S4) (11,13). The miCLIP sites consistently overlapped with known  $m^5C$  sites across 13 different cell lines and tissues, and the greatest overlap was found in NSUN2-



**Figure 2.** BS-sequencing confirms NSUN6 methylation sites. (A) Pipeline of data analyses using BS-sequencing data. (B) Summary of all mapped reads in the different conditions (left panel). WT: Wild-type; KO: knockout; RES: Rescue of NSUN6. Total number of mapped reads (right panel). (C) Overlap of miCLIP sites with m<sup>5</sup>C sites detected by BS-seq in H9 and HEK cells. (D) Methylated sites identified by miCLIP and BS-seq in the indicated conditions in HEK and H9 cells. (E) m<sup>5</sup>C sites identified by miCLIP and BS-seq (dark blue) in H9 (left panel) and HEK (right panel) cells. (F) Overlap of RNAs containing m<sup>5</sup>C sites detected by both miCLIP and by BS-seq in H9 and HEK cells. (G) Quantification of m<sup>5</sup>C in purified mRNA (left) and 18S rRNA (right) by mass spectrometry in the indicated HEK samples. (H) NSUN6-dependent methylation sites identified by BS-seq only in H9 and HEK cells. Red: CTCCA consensus motif. (I) Heatmap of tRNA Thr and Cys isotypes carrying a NSUN6-mediated methylation site (red; star). (J) Quantification of (I) showing average methylation levels in the indicated samples.



**Figure 3.** Methylation at NSUN6 consensus sequence. (A) Number of protein coding miCLIP sites and coverage of BS-seq reads. (B) Fraction of methylation sites identified in the indicated datasets overlapping with NSUN6 miCLIP sites. (C) NSUN6-targeted sites with confirmed m<sup>5</sup>C in more than 5 out of 14 different datasets. (D–H) Representative heatmaps showing the methylation levels in the indicated selected mRNAs (D–G), tRNA<sup>Thr</sup> (CGT) as a control (H). (I) NSUN6-dependent methylation around the consensus sequence. (J, K) Mean methylation levels in knockout (KO), wild-type (WT), and NSUN6-overexpressing (OEX) cells at 994 miCLIP sites containing the consensus motif (J), and 275 sites without the consensus motif (K). Shown are biological replicates in H9 and HEK cells. (L–O) Methylation levels at published m<sup>5</sup>C sites (11) containing the consensus motif identified in all datasets (L) or in selected tissues of frontal cortex (M) and testis (N), or lacking the motif (O). (P, Q) Illustration of the luciferase reporter containing the *Angell* 3' UTR and transfection into two NSUN6 HEK knockout clones (KO1, KO2) and one rescued KO clone re-expressing NSUN6 (P), or co-transfection with constructs expression the wild-type (wt) or methylation-deficient (mut) NSUN6 protein in HEK\_KO1 (Q). (R) Luciferase reporter assay using constructs shown in (P). (S) Luciferase reporter assay using constructs shown in (Q). \*\*\*\* $p_{\text{adj}} < 0.0001$ ; \*\*\* $p_{\text{adj}} < 0.001$ ; \* $p_{\text{adj}} < 0.05$ , one-way ANOVA (R,S). (T) RT-QPCR for selected mRNAs carrying NSUN6-methylated cytosine in control, knockout (KO) and over-expressing (OEX) H9 cells. Data are normalized to 18S rRNA and shown relative to control cells. Outlier (highest and lowest values) are removed. \*\* $P_{\text{adj}} < 0.01$ ; \* $P_{\text{adj}} < 0.05$ . Two-way ANOVA (all data points).



knockout cells (Figure 3B). Thus, many of the NSUN6-dependent miCLIP sites were confirmed to be methylated in a wide range of biological conditions (Figure 3C). For instance, the m<sup>5</sup>C site found in translocase of inner mitochondrial membrane 50 (TIMM50) was the most commonly detected NSUN6-specific site and present in 13 out of 14 datasets, including our study (Figure 3C; Supplementary Table S4). As expected, the methylation levels of NSUN6-targeted mRNA varied between conditions, but was often supported by multiple additional datasets (Figure 3D–H; Supplementary Figure S3A). Thus, NSUN6 miCLIP reliably detected m<sup>5</sup>C in the transcriptome.

Next, we asked whether the consensus motif was important for NSUN6-specific methylation. NSUN6 miCLIP sites containing the motif CTC[CT]A lacked m<sup>5</sup>C in knockout cells, but showed enhanced methylation levels in wild-type and over-expressing cells (Figure 3I, J; Supplementary Table S6). miCLIP sites without the consensus motif displayed constant methylation levels, independent of NSUN6-expression (Figure 3K).

To further confirm that only CTC[CT]A-containing methylation sites depended on NSUN6, we analysed methylation levels in our BS-seq data across all previously identified m<sup>5</sup>C sites (Supplementary Table S7) (11,13). The level of methylation across published m<sup>5</sup>C sites also strongly correlated with expression of NSUN6, but only when the NSUN6-target motif was present (Figure 3L–O). We obtained the same results when using all identified m<sup>5</sup>C sites or only those detected in frontal cortex and testis (Figure 3L–O).

In conclusion, NSUN6-specific methylation of mRNA is widely present in published datasets and strictly depended on the consensus sequence motif.

### NSUN6-targeting enhances mRNA abundance and translation

To test how NSUN6 affected the targeted mRNAs, we cloned the 3' UTR of *Angell* into a luciferase reporter construct. First, we expressed the reporter in NSUN6 knockout (KO) and rescued (RES) HEK clones (Figure 3P). Second, we co-transfected the reporter with constructs expressing either the wild-type (wt) or methylation-deficient mutant (mut) NSUN6 protein (Figure 3Q). The reporter activity was significantly higher when NSUN6 was present (Figure 3R). Next, we asked whether the methylation activity was required to enhance the reporter activity. Re-expression of the wild-type (wt) NSUN6 protein significantly up-regulated the reporter activity when compared to the mutated (mut) NSUN6 protein (Figure 3S). Thus, NSUN6-dependent methylation enhanced the reporter activity.

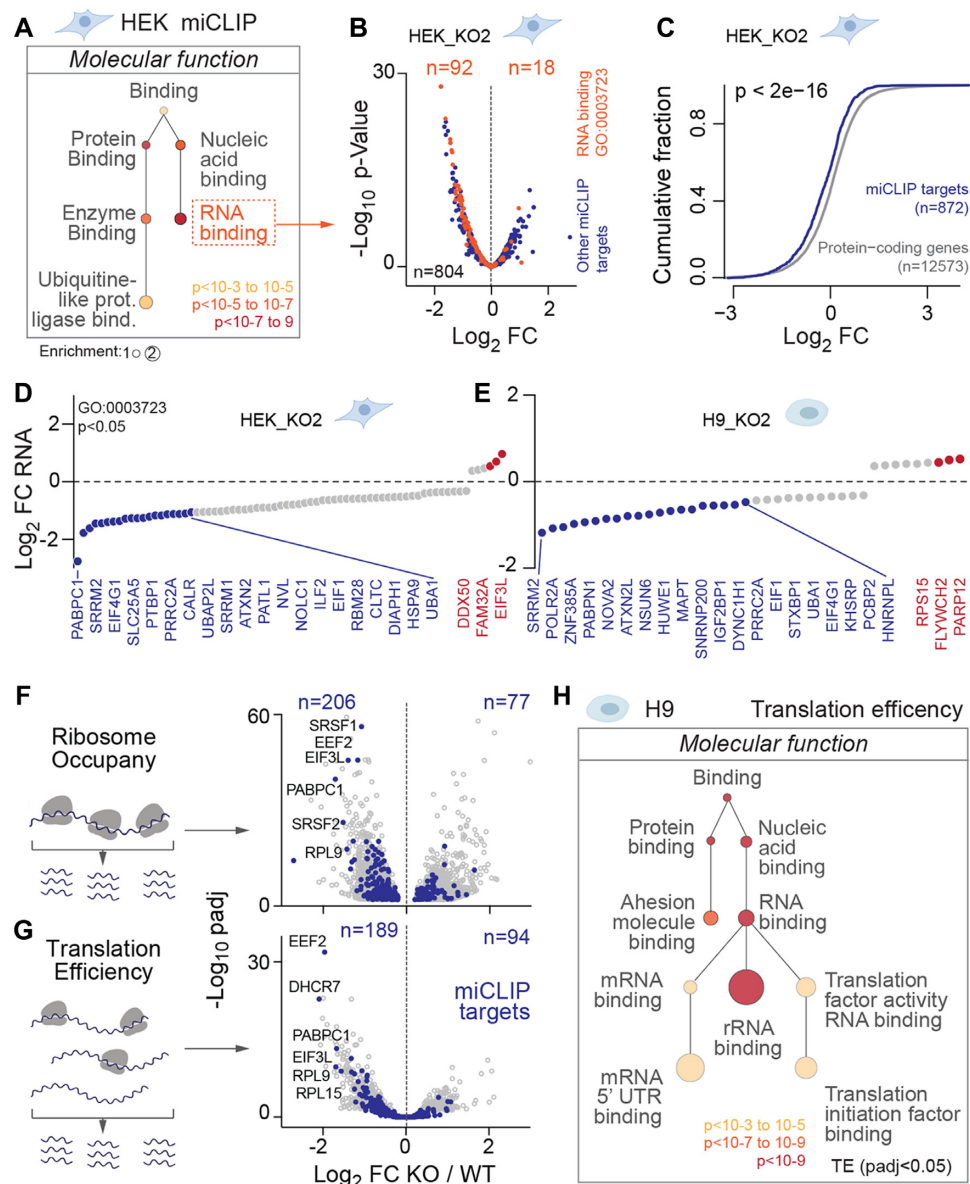
To further characterize the effect of NSUN6-dependent methylation on endogenous mRNA levels, we measured the level of m<sup>5</sup>C containing mRNAs in the absence and presence of NSUN6 (Figure 3T; Supplementary Figure S3B). In both knockout cell lines, mRNA levels were reduced in the absence of NSUN6, but reversed to normal levels when NSUN6 expression was restored (Figure 3T; Supplementary Figure S3B), suggesting that NSUN6-mediated methylation directly or indirectly enhanced mRNA levels.

To test whether NSUN6-targeted mRNAs shared common functions, we identified enriched gene ontology (GO) terms in all protein coding RNAs containing a miCLIP site ( $n = 906$ ; Supplementary Table S4). NSUN6-targeted mRNAs mostly encoded for RNA- and protein-binding proteins, indicating a role in regulating gene expression (Figure 4A). Most NSUN6 miCLIP targets were down-regulated in knockout cells in RNA-seq experiments (Figure 4B, C; Supplementary Figure S4A–C; Supplementary Table S8). This was highly significant in HEK cells, where an mRNA with miCLIP sites were 5-fold more likely to be down-regulated compared with mRNAs without miCLIP sites (Supplementary Figure S4D). Repressed mRNAs encoded proteins involved in both RNA processing and translation, such as the polyadenylate-binding proteins PABPC1 and PABPN1 and the translation initiation factors EIF4G1 and EIF1 (Figure 4D, E). Thus, our data identify a function for NSUN6-targeted mRNAs in regulating post-transcriptional and translational processes (Supplementary Figure S4E). Transcriptional profiling of NSUN6-depleted HEK and H9 cells confirmed that genes encoding for RNA-binding proteins, and in particular of pre-mRNA and 3' UTR, were significantly repressed (Supplementary Figure S4F–H; Supplementary Table S8).

Since NSUN6 mostly methylated 3' UTRs, we speculated that deposition of m<sup>5</sup>C regulated mRNA translation. To test for translation differences, we performed ribosome profiling in wild-type and knockout H9 cells (Supplementary Table S9) (41). We confirmed that ribosome occupancy of NSUN6 targeted mRNAs was lower in the absence of NSUN6 (Figure 4F, blue dots; Supplementary Figure S4I; Supplementary Table S9). Since ribosome occupancy cannot distinguish between altered mRNA abundance or higher coverage of ribosomes per mRNA, we next calculated translation efficiencies. The translation efficiency of most NSUN6-targeted mRNAs was repressed (Figure 4G, blue dots; Supplementary Figure S4J; Supplementary Table S9). However, global protein synthesis was not significantly affected by depletion of NSUN6 (Supplementary Figure S4K). Again, inhibition of translation primarily affected RNA- and protein-binding factors involved in regulating mRNA processing and translation (Figure 4H). Thus, our data indicated that NSUN6 regulated gene expression on the post-transcriptional and translational level.

### NSUN6-targeted CTCCA motifs mark translation termination sites

To determine how NSUN6-dependent methylation affected mRNA translation, we calculated the ribosome occupancy around miCLIP sites in mRNAs containing the CTCCA motif ( $n = 994$ ) (Figure 5A). The ribosome footprints displayed a strong bias towards only one side of the CTCCA motif. Therefore, we grouped the ribosomes occupancies into (a) lower, (b) unchanged or (c) higher up-stream of the NSUN6 miCLIP site (Figure 5A,B). The majority of mRNAs had higher ribosome occupancies up-stream of the miCLIP site (Figure 5B,C), which was expected because most miCLIP sites localized to 3' UTRs (Figure 5D). The difference in ribosome occupancy at miCLIP sites was independent of mRNA levels (Supplementary Figure S5A).

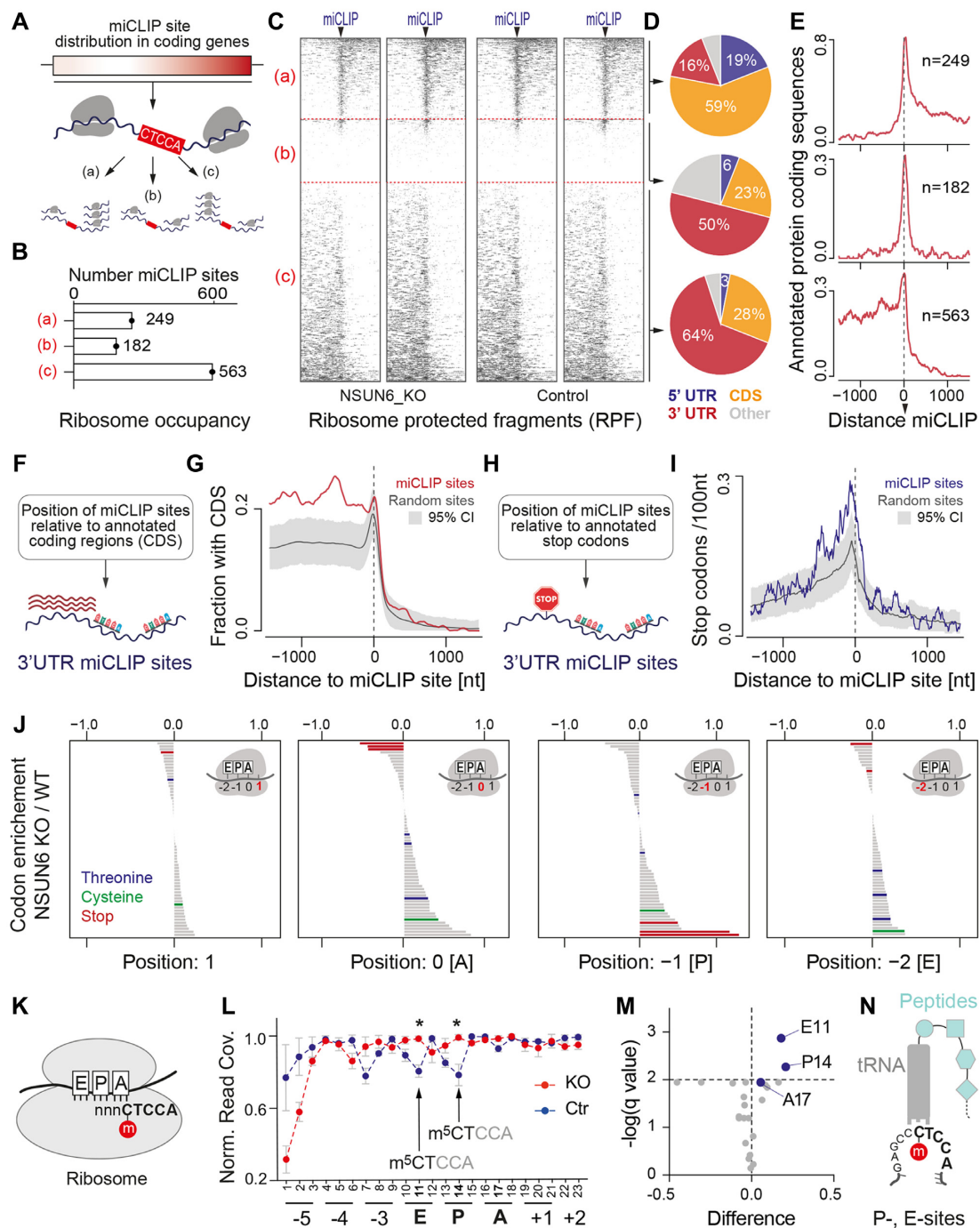


**Figure 4.** NSUN6-targeted RNAs regulate RNA processing and translation. (A) Gene Ontology (GO) analysis (molecular function) of all NSUN6-targeted protein coding RNAs in HEK cells using GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). Background: All expressed genes in HEK cells. (B) Log<sub>2</sub> fold-change (FC) expression of all miCLIP targets. Orange dots: miCLIP targets belonging to the GO category 'RNA-binding' (GO: 0003723). Blue dots: All other miCLIP targets. (C) Cumulative fraction of log<sub>2</sub> fold-change (FC) expression levels of all miCLIP targets (blue) compared to all other protein coding genes. *P*-value was calculated using the Kolmogorov-Smirnov test. (D, E) Examples of top up- (red) and down-regulated (blue) mRNAs targeted by NSUN6 in HEK (D) and H9 cells (E) when NSUN6 is depleted. (F, G) Ribosome occupancy (F) and translation efficiency (G) (illustration, left panels) of all ribosome covered mRNAs (grey) and miCLIP targets (blue) in wild-type (WT) versus NSUN6 knockout (KO) H9 cells. (H) Gene Ontology analysis of mRNAs with significantly (padj<0.05) changed translation efficiency.

Moreover, the sharp drop in ribosome occupancy shortly after the miCLIP site in group (c), suggested translation termination. To further explore the idea that NSUN6-targeted CTCCA motifs marked translation termination, we measured the level of annotated protein coding sequences around the miCLIP site in groups (a), (b) and (c) (Figure 5E). We were surprised to see protein coding sequences directly abutting miCLIP sites in group (c), because most of those miCLIP sites overlapped with non-coding 3'UTRs (Figure 5D; Supplementary Figure S5B). To confirm this result, we repeated the analyses only considering

3' UTR miCLIP sites (Figure 5F), revealing a significant enrichment of coding sequences up-stream of the miCLIP site, followed by a sharp drop thereafter (Figure 5G). As a control we used randomly selected 3' UTR CTCCA sites (Figure 5G).

The absence of ribosome footprints directly after the miCLIP sites suggested stalling or removal of ribosomes. Because the miCLIP consensus sequence does not cover stop codons (Figure 1I), we asked where stop codons were positioned relative to the miCLIP sites (Figure 5H). We find annotated stop codons significantly enriched in close prox-



**Figure 5.** NSUN6 miCLIP sites with CTCCA consensus motif mark translation termination. (A) Illustration of the Ribo-seq data analysis. (B) Number of miCLIP sites with ribosome occupancy shown in (A). (C) Heatmaps of Ribo-seq reads around the miCLIP sites in NSUN6 knockout (KO) and control cells (shown are two representative replicates each). Arrowheads indicate position 0 of miCLIP sites. (D) Percentages of miCLIP sites located in the CDS, 5' and 3' UTRs in the indicated groups (a–c) (E) Fraction of annotated protein coding sequences with (a) lower (upper panel), (b) unchanged (middle panel), or (c) higher (lower panel) number of reads before the miCLIP sites. (F, G) Illustration (F) and quantification (G) of annotated CDS around 509 miCLIP or randomly selected motif sites in 3' UTRs. The random selection was repeated 1000 times and the mean and confidence interval are shown. (H, I) Illustration (H) and quantification (I) of annotated stop codons around 509 miCLIP or randomly selected sites in 3' UTRs. Random selection repeated as for (G). (J) Codon enrichment in NSUN6 knockout cells versus control cells at the indicated positions of the ribosomes' active sites. Stop codons are marked red. Codons requiring NSUN6-methylated tRNAs are marked in blue and green. (K) Illustration of codon usage analyses covering the miCLIP consensus sequence (CTCCA). (L–N) Normalized read coverage with CTCCA at the indicated position of the ribosome footprint (N) with calculated significance levels (M) and illustration of codon positions at tRNAs at the P- and E-sites (N).



imity to, but mostly up-stream of, miCLIP sites (Figure 5I). Together, our data revealed that NSUN6-targeted CTCCA sites marked translation termination.

To explore whether NSUN6 was involved in regulating translation termination, we evaluated whether depletion of NSUN6 resulted in stop codon biases during mRNA translation. When we calculated the codon frequencies at the ribosome active sites (E, P, A) we found stop codons were enriched at the ribosomal P-site in the absence of NSUN6 (Figure 5J). As the presence of a stop codon at the ribosome A-site is generally the signal to terminate protein synthesis, our data indicated altered translation termination in NSUN6-depleted cells. In contrast, we found no differences in codon usage for the NSUN6-methylated tRNAs Thr and Cys in NSUN6-depleted cells (Figure 5J).

Together, our data indicated that NSUN6-targeted CTCCA sites marked translation termination, even when these sites occurred in the 3' UTRs (Supplementary Figure S5B). Detecting translation events in the 3' UTR suggests that the ribosome has read through stop codons in these specific transcripts. While ribosome-profiling experiments commonly uncover stop-codon read-through (42–44), it is a very rare event (0.02% to 1.4%), and largely caused by incidental cellular errors during translation (42,43,45,46). Moreover, the rate of transcriptional read-through often depends on specific stop codons and their flanking sequences (47). While NSUN6-targeted mRNAs were not consistently enriched for specific stop codons (Supplementary Figure S5C), we measured slightly fewer alternative stops between the annotated stop and the miCLIP site when compared to nearby control sequences of the same lengths (Supplementary Figure S5D). Thus, our data suggested a potential role of NSUN6 in promoting translation fidelity by ensuring translation termination at targeted mRNAs.

To test whether NSUN6 methylation contributed to translation fidelity, we measured ribosome occupancies at CTCCA motifs (Figure 5K). In the presence of NSUN6, we found that m<sup>5</sup>CTCCA motifs appeared significant less often at positions 11 and 14 of the E- and P-binding sites for tRNA in the ribosome (Figure 5K–M). In these cases, the corresponding 'CCA' bases of the motif occupy the ribosome A- or P-site respectively (Figure 5L). Since 'CCA' encodes for proline, we confirmed that proline codons were significantly enriched at the ribosome A-site (Supplementary Figure S5E; Supplementary Table S10).

In conclusion, mRNAs with the codon sequence (N-m<sup>5</sup>C-T) followed by (C–C–A) spent less time at the ribosomes' P- and E-site in the presence of NSUN6, possibly due to a faster removal of the ribosome (Figure 5N).

### NSUN6 is dispensable for development but might be a prognostic marker in cancer

Knockout of NSUN6 in H9 and HEK cells did not cause any apparent cellular phenotype. Since RNA modification enzymes often act directly in response to external stimuli (2), we asked whether differentiation of human embryonic stem cells was affected when NSUN6 was depleted. We differentiated the H9 cells into embryoid bodies and confirmed reduced levels of NSUN6-targeted mRNAs in embryoid bodies lacking NSUN6 (Supplementary Figure

S6A). While pluripotency factors were not differentially expressed, some mesoderm markers and *Hoxa1* were consistently reduced in the absence of NSUN6 (Supplementary Figure S6B). Finally, we asked whether loss of NSUN6 affected embryonic development. To generate total knockout mice, we used two embryonic stem cell clones carrying the LacZ-reporter in exon 2 of the *Nsun6* gene leading to transcriptional disruption of a functional NSUN6 protein (Supplementary Figure S6C). Although LacZ expression revealed that *Nsun6* was quite ubiquitously expressed, we observed no gross phenotype in the absence of NSUN6 (Supplementary Figure S6D). We concluded that mouse embryonic development was largely unaffected by total loss of NSUN6.

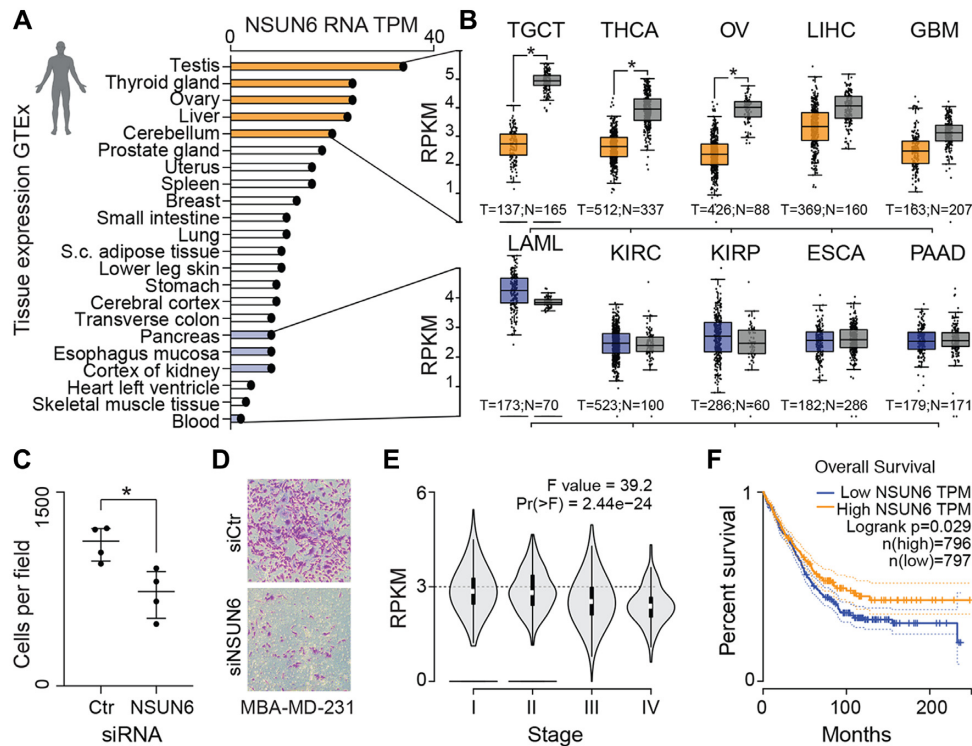
To identify other potential cellular functions of NSUN6, we compared *Nsun6* expression levels in human tissues collocated in the Genotype-Tissue Expression (GTEx) database (Figure 6A). *Nsun6* was ubiquitously expressed with highest levels found in testis and lowest expression in blood (Figure 6A). When we analysed tumours derived from tissues with high or low *Nsun6*-expression, we found *Nsun6* mRNA levels to be down-regulated in tumours, but only when derived from high *Nsun6*-expressing tissues (Figure 6B; upper panels). *Nsun6* was significantly down-regulated in tumours derived from testis, thyroid and ovaries. In contrast, we found no difference in RNA levels when the tumours derived from low-expressing tissues, such as blood, kidney or pancreas (Figure 6B; lower panels).

In line with our finding that *Nsun6* was higher expressed in normal liver than liver tumours, over-expression of NSUN6 has recently been shown to inhibit cell proliferation of liver cancer cells (48). Cell proliferation and migration are often reciprocally controlled (49), and we find that NSUN6-expression enhanced migration in cancer cells (Figure 6C, D; Supplementary Figure S6E). However, *Nsun6*-expression was also significantly lower in later pathological stages of tumours derived from high expressing tissues (Figure 6B, upper panel; Figure 6E), and correlated with better patient survival (Figure 6F). Thus, NSUN6 might be a novel biomarker for positive patient outcome in cancers derived from testis, ovary, thyroid, liver and brain.

In summary, here we identify NSUN6 as a methyltransferase strictly targeting mRNAs at a consensus sequence motif near non-canonical translation termination sites. Loss of NSUN6-mediated methylation decreased mRNA levels and reduced translation. NSUN6 was not required for embryonic development. However, NSUN6 was down-regulated in at least some cancers and might be a novel biomarker predicting patient outcome.

### DISCUSSION

RNA modifications add flexibility, diversity and complexity to cell type and state-specific gene expression programs. Mapping these RNA modifications on single nucleotide resolution is a critical step towards understanding the underlying regulatory pathways. Despite recent advances in technologies to detect RNA modifications in mRNAs (3,50–52), the prevalence and precise location of in particular low abundance modifications remain often unclear (9). Al-



**Figure 6.** NSUN6 as a putative predictive biomarker in cancer. (A) *Nsun6* RNA expression levels in adult human tissues (<https://www.gtexportal.org/home/>). (B) *Nsun6* RNA expression levels in tumours derived from high (upper panel) and low (lower panel) *Nsun6* expressing tissues shown in (A) (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). (C, D) Knock-down of NSUN6 (C) and migration assay (D) of cancer cells (MBA-MD-231). \* *P*-value < 0.05. Unpaired *t*-test. (E, F) Stage plot (E) and survival plot (F) of *Nsun6*-low expressing cancers shown in (B; upper panel).

though the need for more robust detection methods was recognised very early in the field (53), RNA BS-seq remains the method of choice for mapping m<sup>5</sup>C transcriptome-wide because it is currently the only available method detecting m<sup>5</sup>C sites on endogenous mRNAs in a quantitative manner (39).

Optimizing RNA BS-seq protocols and computational analyses is one strategy to improve the detection of m<sup>5</sup>C (8,11). The most recent study identified about 100 m<sup>5</sup>C sites per mega base in a given mammalian tissue or cell type (11). Huang *et al.* (11) further demonstrated that many but not all detected sites were NSUN2-dependent, and that NSUN2-independent sites were marked by a 3'TCCA motif. The authors suggested that this sequence motif was targeted by an uncharacterised cytosine-5 RNA methyltransferase (11). In our study, we discover the same consensus motif (CTCCA) in mRNAs and further demonstrate that it is in fact targeted by the characterised cytosine-5 methyltransferase NSUN6.

Together, our data implicate a role for NSUN6-methylation in regulating translation termination. The presence of the methyl group at CTCCA motifs in protein coding RNA correlated with greater RNA abundance and translation, while the motif itself was enriched in 3' UTRs near sites of translation termination down-stream of annotated stop codons. Ribosome profiling further revealed an enrichment of stop codons at the ribosome P-site in NSUN6-depleted cells. Given that ribosome footprints occurred mostly up-stream, but rarely down-stream, of miCLIP sites including in 3' UTRs, NSUN6-dependent

methylation might be part of quality control mechanisms ensuring termination of translation, possibly after stop codon read-through. The low levels of stop codon read-through may explain why the percentage of methylation is low in most NSUN6-targeted mRNAs. Our data further indicate a potential function of NSUN6 in translation termination fidelity of primarily RNA and protein-binding proteins in adult tissues of testis, ovaries and liver for example. Our finding that targeted mRNAs are more abundant in the presence of m<sup>5</sup>C is in line with the recent finding that m<sup>5</sup>C protects maternal mRNA from decay in the maternal-to-zygotic transition (54).

We find that most of m<sup>5</sup>C sites in the protein coding RNAs are catalysed by NSUN6. Our observation that the majority of such sites occur at low stoichiometry is one explanation why the prevalence of m<sup>5</sup>C in mRNAs has previously been controversial. Furthermore, the low methylation levels of mRNAs hampers studying the functional relevance of m<sup>5</sup>C, and may also explain the apparent lack of any gross phenotype in NSUN6-depleted mice. However, NSUN6 may confer cellular fitness advantages in specific environmental context, as we find NSUN6 to be higher expressed in healthy tissues than in tumours.

## DATA AVAILABILITY

BS-seq data are available on GEO (GSE125046). RNA-seq, Ribo-seq, miCLIP data are up-loaded onto GEO (GSE140997). The scripts used for the alignment and pro-

cessing of the BS-seq data are available at [<https://github.com/susbo/trans-bsseq>].

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE140997>). Reviewer access: qralkcqsluzfwn.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank everybody who provided us with reagents. We gratefully acknowledge the support of all the Wellcome MRC Cambridge Stem Cell Institute core facility managers, in particular Maike Paramor. Some figure panels were created with BioRender.com.

## FUNDING

Cancer Research UK (CR-UK); Medical Research Council (MRC); European Research Council (ERC); Parts of this research in Michaela Frye's laboratory was supported by core funding from Wellcome and MRC to the Wellcome MRC Cambridge Stem Cell Institute; the research in Shobbir Hussain's laboratory was funded by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC). Funding for open access charge: DKFZ.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Boccalletto, P., Machnicka, M.A., Purta, E., Piatkowski, P., Baginski, B., Wirecki, T.K., de Crecy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P.A., Kotter, A. *et al.* (2018) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.*, **46**, D303–D307.
- Frye, M., Harada, B.T., Behm, M. and He, C. (2018) RNA modifications modulate gene expression during development. *Science*, **361**, 1346–1349.
- Helm, M. and Motorin, Y. (2017) Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 275–291.
- Shi, H., Wei, J. and He, C. (2019) Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers. *Mol. Cell*, **74**, 640–650.
- Delaunay, S. and Frye, M. (2019) RNA modifications regulating cell fate in cancer. *Nat. Cell Biol.*, **21**, 552–559.
- Zaccara, S., Ries, R.J. and Jaffrey, S.R. (2019) Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 608–624.
- Grozhi, A.V. and Jaffrey, S.R. (2017) Epitranscriptomics: shrinking maps of RNA modifications. *Nature*, **551**, 174–176.
- Legrand, C., Tuorto, F., Hartmann, M., Liebers, R., Jacob, D., Helm, M. and Lyko, F. (2017) Statistically robust methylation calling for whole-transcriptome bisulfite sequencing reveals distinct methylation patterns for mouse RNAs. *Genome Res.*, **27**, 1589–1596.
- Trixl, L. and Lusser, A. (2019) Getting a hold on cytosine methylation in mRNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 339–340.
- Borland, K., Diesend, J., Ito-Kureha, T., Heissmeyer, V., Hammann, C., Buck, A.H., Michalak, S. and Kellner, S. (2019) Production and application of stable isotope-labeled internal standards for RNA modification analysis. *Genes (Basel)*, **10**, 26.
- Huang, T., Chen, W., Liu, J., Gu, N. and Zhang, R. (2019) Genome-wide identification of mRNA 5-methylcytosine in mammals. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 380–388.
- Hussain, S., Sajini, A.A., Blanco, S., Dietmann, S., Lombard, P., Sugimoto, Y., Paramor, M., Gleeson, J.G., Odom, D.T., Ule, J. *et al.* (2013) NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell Rep.*, **4**, 255–261.
- Yang, X., Yang, Y., Sun, B.F., Chen, Y.S., Xu, J.W., Lai, W.Y., Li, A., Wang, X., Bhattarai, D.P., Xiao, W. *et al.* (2017) 5-methylcytosine promotes mRNA export - NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m(5)C reader. *Cell Res.*, **27**, 606–625.
- Chen, X., Li, A., Sun, B.F., Yang, Y., Han, Y.N., Yuan, X., Chen, R.X., Wei, W.S., Liu, Y., Gao, C.C. *et al.* (2019) 5-methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs. *Nat. Cell Biol.*, **21**, 978–990.
- Blanco, S., Dietmann, S., Flores, J.V., Hussain, S., Kutter, C., Humphreys, P., Lukk, M., Lombard, P., Treps, L., Popis, M. *et al.* (2014) Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *EMBO J.*, **33**, 2020–2039.
- Tuorto, F., Liebers, R., Musch, T., Schaefer, M., Hofmann, S., Kellner, S., Frye, M., Helm, M., Stoecklin, G. and Lyko, F. (2012) RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 900–905.
- Van Haute, L., Dietmann, S., Kremer, L., Hussain, S., Pearce, S.F., Powell, C.A., Rorbach, J., Lantaff, R., Blanco, S., Sauer, S. *et al.* (2016) Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat. Commun.*, **7**, 12039.
- Haag, S., Sloan, K.E., Ranjan, N., Warda, A.S., Kretschmer, J., Blessing, C., Hubner, B., Seikowski, J., Dennerlein, S., Rehling, P. *et al.* (2016) NSUN3 and ABH1 modify the wobble position of mt-tRNA<sup>Met</sup> to expand codon recognition in mitochondrial translation. *EMBO J.*, **35**, 2104–2119.
- Nakano, S., Suzuki, T., Kawarada, L., Iwata, H., Asano, K. and Suzuki, T. (2016) NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA(Met). *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 546–551.
- Haag, S., Warda, A.S., Kretschmer, J., Gunnigmann, M.A., Hobartner, C. and Bohnsack, M.T. (2015) NSUN6 is a human RNA methyltransferase that catalyzes formation of m5C72 in specific tRNAs. *RNA*, **21**, 1532–1543.
- Sajini, A.A., Choudhury, N.R., Wagner, R.E., Bornelov, S., Selmi, T., Spanos, C., Dietmann, S., Rappsilber, J., Michlewski, G. and Frye, M. (2019) Loss of 5-methylcytosine alters the biogenesis of vault-derived small RNAs to coordinate epidermal differentiation. *Nat. Commun.*, **10**, 2550.
- Sugimoto, Y., Konig, J., Hussain, S., Zupan, B., Curk, T., Frye, M. and Ule, J. (2012) Analysis of CLIP and iCLIP methods for nucleotide-resolution studies of protein-RNA interactions. *Genome Biol.*, **13**, R67.
- Gkatza, N.A., Castro, C., Harvey, R.F., Heiss, M., Popis, M.C., Blanco, S., Bornelov, S., Sajini, A.A., Gleeson, J.G., Griffin, J.L. *et al.* (2019) Cytosine-5 RNA methylation links protein synthesis to cell metabolism. *PLoS Biol.*, **17**, e3000297.
- Blanco, S., Kurowski, A., Nichols, J., Watt, F.M., Benitah, S.A. and Frye, M. (2011) The RNA-methyltransferase Misu (NSun2) poises epidermal stem cells to differentiate. *PLoS Genet.*, **7**, e1002403.
- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M. and Lyko, F. (2010) RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev.*, **24**, 1590–1595.
- Ingolia, N.T., Brar, G.A., Rouskin, S., McGeachy, A.M. and Weissman, J.S. (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat. Protoc.*, **7**, 1534–1550.
- Blanco, S., Bandiera, R., Popis, M., Hussain, S., Lombard, P., Aleksic, J., Sajini, A., Tanna, H., Cortes-Garrido, R., Gkatza, N. *et al.* (2016) Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis. *Nature*, **534**, 335–340.
- Bornelov, S., Selmi, T., Flad, S., Dietmann, S. and Frye, M. (2019) Codon usage optimization in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Biol.*, **20**, 119.
- Hansen, K.D., Irizarry, R.A. and Wu, Z. (2012) Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. *Biostatistics*, **13**, 204–216.
- Wang, K., Li, M. and Hakonarson, H. (2010) ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e164.
- King, M.Y. and Redman, K.L. (2002) RNA methyltransferases utilize two cysteine residues in the formation of 5-methylcytosine. *Biochemistry*, **41**, 11218–11225.



32. Liu, Y. and Santi, D.V. (2000) m<sup>5</sup>C RNA and m<sup>5</sup>C DNA methyl transferases use different cysteine residues as catalysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8263–8265.
33. Hussain, S., Benavente, S.B., Nascimento, E., Dragoni, I., Kurowski, A., Gillich, A., Humphreys, P. and Frye, M. (2009) The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability. *J. Cell Biol.*, **186**, 27–40.
34. Redman, K.L. (2006) Assembly of protein-RNA complexes using natural RNA and mutant forms of an RNA cytosine methyltransferase. *Biomacromolecules*, **7**, 3321–3326.
35. Hiller, M., Zhang, Z., Backofen, R. and Stamm, S. (2007) Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition. *PLoS Genet.*, **3**, e204.
36. Maticzka, D., Lange, S.J., Costa, F. and Backofen, R. (2014) GraphProt: modeling binding preferences of RNA-binding proteins. *Genome Biol.*, **15**, R17.
37. Carter, J.M., Emmett, W., Mozos, I.R., Kotter, A., Helm, M., Ule, J. and Hussain, S. (2019) FICC-Seq: a method for enzyme-specified profiling of methyl-5-uridine in cellular RNA. *Nucleic Acids Res.*, **47**, e113.
38. Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K. and Lyko, F. (2009) RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **37**, e12.
39. Frye, M., Jaffrey, S.R., Pan, T., Rechavi, G. and Suzuki, T. (2016) RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 365–372.
40. Liu, R.J., Long, T., Li, J., Li, H. and Wang, E.D. (2017) Structural basis for substrate binding and catalytic mechanism of a human RNA:m<sup>5</sup>C methyltransferase NSun6. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6684–6697.
41. Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R. and Weissman, J.S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, **324**, 218–223.
42. Dunn, J.G., Foo, C.K., Belletier, N.G., Gavis, E.R. and Weissman, J.S. (2013) Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *eLife*, **2**, e01179.
43. Li, C. and Zhang, J.Z. (2019) Stop-codon read-through arises largely from molecular errors and is generally nonadaptive. *PLoS Genet.*, **15**, e1008141.
44. Wangen, J.R. and Green, R. (2020) Stop codon context influences genome-wide stimulation of termination codon readthrough by aminoglycosides. *eLife*, **9**, e52611.
45. Dabrowski, M., Bukowy-Bieryllo, Z. and Zietkiewicz, E. (2015) Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes - The impact of RNA sequence. *RNA Biol.*, **12**, 950–958.
46. Floquet, C., Hatin, I., Rousset, J.P. and Bidou, L. (2012) Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin. *PLoS Genet.*, **8**, e1002608.
47. Loughran, G., Chou, M.Y., Ivanov, I.P., Jungreis, I., Kellis, M., Kiran, A.M., Baranov, P.V. and Atkins, J.F. (2014) Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8928–8938.
48. Wang, Z.L., Li, B., Luo, Y.X., Lin, Q., Liu, S.R., Zhang, X.Q., Zhou, H., Yang, J.H. and Qu, L.H. (2018) Comprehensive genomic characterization of RNA-Binding proteins across human cancers. *Cell Rep.*, **22**, 286–298.
49. De Donatis, A., Ranaldi, F. and Cirri, P. (2010) Reciprocal control of cell proliferation and migration. *Cell Commun. Signal*, **8**, 20.
50. Wang, D.O. (2019) Mapping m(6)A and m(1)A with mutation signatures. *Nat. Methods*, **16**, 1213–1214.
51. Meyer, K.D. (2019) DART-seq: an antibody-free method for global m(6)A detection. *Nat. Methods*, **16**, 1275–1280.
52. Zhou, H., Rauch, S., Dai, Q., Cui, X., Zhang, Z., Nachtergaele, S., Sepich, C., He, C. and Dickinson, B.C. (2019) Evolution of a reverse transcriptase to map N(1)-methyladenosine in human messenger RNA. *Nat. Methods*, **16**, 1281–1288.
53. Hussain, S., Aleksic, J., Blanco, S., Dietmann, S. and Frye, M. (2013) Characterizing 5-methylcytosine in the mammalian epitranscriptome. *Genome Biol.*, **14**, 215.
54. Yang, Y., Wang, L., Han, X., Yang, W.L., Zhang, M., Ma, H.L., Sun, B.F., Li, A., Xia, J., Chen, J. *et al.* (2019) RNA 5-methylcytosine facilitates the Maternal-to-Zygotic transition by preventing maternal mRNA decay. *Mol. Cell*, **75**, 1188–1202.



### 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle

#### Prolog

Queuosin (Q) ist ein hypermodifiziertes Nukleosid, welches in humaner tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup> und tRNA<sup>Asp</sup> vorgefunden werden kann. Während in tRNA<sup>Tyr</sup> an dieses noch ein zusätzlicher Galaktosylzucker (Gal) gekoppelt ist, wird in tRNA<sup>Asp</sup> diese Rolle durch Mannose (Man) eingenommen. Nach erfolgreicher Vollsynthese von Galaktosyl-Queuosine (GalQ), welche in Thumbs *et al.* erstmals beschrieben wird, konnte das Vorhandensein ebendieses Nukleosids in der RNA von Mäuseleber bestätigt werden. Des Weiteren wurde die Häufigkeit des Auftretens der Q-Modifikationen in verschiedenen Mäuseorganen näher untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit ansteigendem Alter der Mäuse die Abundanz der Q-Modifikationen ansteigt. Dieser Effekt ist bei Q ohne angehängte Zucker-Gruppe besonders ausgeprägt und abhängig vom jeweilig untersuchten Organ. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Zufütterung von Queuin (QBase – Nukleobase von Queuosine) in Zellkultur auf die Q-Modifikationen auswirkt. Während geringe Level der Modifikationen auch ohne spezielle Zufütterung von Queuin in den jeweiligen tRNA-Isoakzeptoren vorhanden sind, steigen diese mit der Zufütterung um ein zwei- bis dreifaches an. Im weiteren Verlauf dieses Projekts wurde untersucht, wie sich eine solche Zufütterung auf die allgemeine Abundanz der tRNA-Isoakzeptoren und der Prozessierung des Modifikationsprofils auswirkt.

„Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues“, P. Thumbs, T. T. Ensfielder, M. Hillmeier, M. Wagner, **M. Heiss**, *et al.*; *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **2020**, 59 (30): 12352.

Autorenbeitrag: Alle Experimente in Zellkultur, die entsprechende RNA-Isolation und Aufreinigung sowie die Quantifizierung über LC-MS/MS wurden von mir durchgeführt. Die Synthese von Galaktosyl-Queuosine wurde größtenteils von Peter Thumbs und Markus Hillmeier durchgeführt, während Timm Ensfielder und Mirko Wagner primär für die Präparation und Auswertung der Maus-RNA zuständig waren.

Kopie des Artikels mit Erlaubnis des Verlages: <https://www.wiley-vch.de/de/>





## Hypermodified Nucleosides Hot Paper

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 12352–12356

International Edition: doi.org/10.1002/anie.202002295

German Edition: doi.org/10.1002/ange.202002295

## Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues

Peter Thumbs<sup>+</sup>, Timm T. Ensfielder<sup>+</sup>, Markus Hillmeier<sup>+</sup>, Mirko Wagner<sup>+</sup>, Matthias Heiss, Constanze Scheel, Alexander Schön, Markus Müller, Stylianos Michalakakis, Stefanie Kellner, and Thomas Carell\*

In memory of Rolf Huisgen

**Abstract:** Queuosine (Q) is a hypermodified RNA nucleoside that is found in tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, and tRNA<sup>Asp</sup>. It is located at the wobble position of the tRNA anticodon loop, where it can interact with U as well as C bases located at the respective position of the corresponding mRNA codons. In tRNA<sup>Tyr</sup> and tRNA<sup>Asp</sup> of higher eukaryotes, including humans, the Q base is for yet unknown reasons further modified by the addition of a galactose and a mannose sugar, respectively. The reason for this additional modification, and how the sugar modification is orchestrated with Q formation and insertion, is unknown. Here, we report a total synthesis of the hypermodified nucleoside galactosyl-queuosine (galQ). The availability of the compound enabled us to study the absolute levels of the Q-family nucleosides in six different organs of newborn and adult mice, and also in human cytosolic tRNA. Our synthesis now paves the way to a more detailed analysis of the biological function of the Q-nucleoside family.

In all three domains of life, RNA contains next to the canonical bases (A, C, G, and U) a large variety of modified nucleosides.<sup>[1]</sup> Most of these are chemically simple derivatives

of the canonical nucleosides. They often carry methylations at various positions of the heterocycle or the sugar, but others are heavily modified, involving multistep biosynthesis pathways. Queuosine **1** (Q) is one of the most complex of these so-called hypermodified nucleosides. (Figure 1). It is found in a large number of different species and also present in the cytosolic and mitochondrial tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>His</sup>, and tRNA<sup>Asn</sup> of humans.<sup>[2–8]</sup> Interestingly, in the human cytosolic tRNA<sup>Tyr</sup> and tRNA<sup>Asp</sup>, Q is further modified with galactose (galQ) and mannose (manQ), respectively.<sup>[9,10]</sup> In these tRNAs, the sugar is proposed to be attached to the homoallylic hydroxyl group of the cyclopentene ring system that is linked to the 7-deazaheterocycle.<sup>[11]</sup> While the chemical synthesis of Q has been achieved,<sup>[12–14]</sup> no reports exist about the preparation of its sugar-modified derivatives galQ **2** and manQ **3**, which has hampered investigations of their biological role. Accordingly, the exact function of galQ and manQ as part of the human cytosolic tRNA<sup>Tyr</sup> and tRNA<sup>Asp</sup> is unknown. In addition, we do not know to which extent the corresponding tRNAs are modified with different Q-family nucleosides, and how the G/Q-exchange process and the sugar derivatization is orchestrated. Furthermore, quantitative data about Q-modification levels in different organs is also lacking.

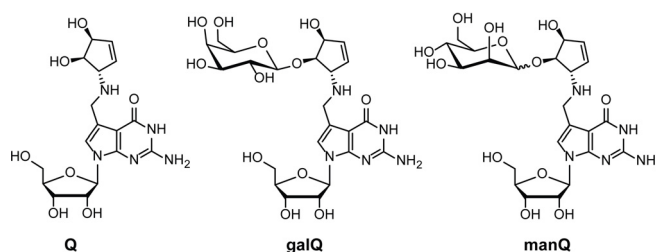
To address these questions, we performed the first total synthesis of galactosyl-queuosine **2**. This allowed us to confirm its proposed structure and to report the absolute levels of all Q-family members in different tissues of newborn and adult mice. Finally, we were able to measure to which extent human cytosolic tRNAs are modified with the three Q-family nucleosides.

[\*] Dr. P. Thumbs,<sup>[+]</sup> M. Sc. T. T. Ensfielder,<sup>[+]</sup> M. Sc. M. Hillmeier,<sup>[+]</sup> Dr. M. Wagner,<sup>[+]</sup> M. Sc. M. Heiss, M. Sc. A. Schön, Dr. M. Müller, Dr. S. Kellner, Prof. Dr. T. Carell  
Department of Chemistry  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)  
E-mail: Thomas.Carell@lmu.de  
Homepage: <https://www.carellgroup.de>  
M. Sc. C. Scheel, Prof. Dr. S. Michalakakis  
Department of Pharmacy  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)  
Prof. Dr. S. Michalakakis  
Department of Ophthalmology  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Mathildenstr. 8, 80336 Munich (Germany)

[+] These authors contributed equally to this work.

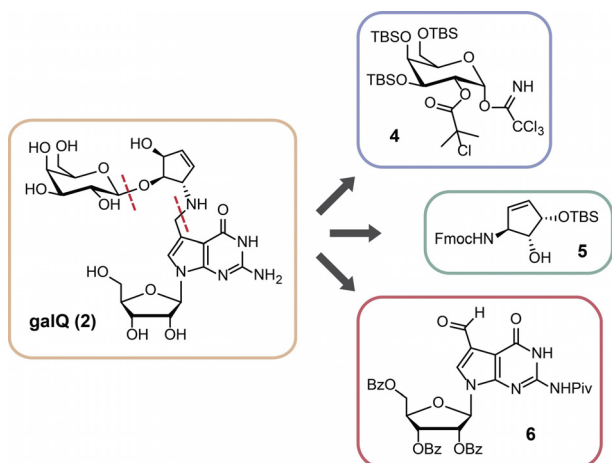
Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under: <https://doi.org/10.1002/anie.202002295>.

© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**Figure 1.** Depiction of the hypermodified RNA nucleoside queuosine (**1**, Q) and of the galactosylated and mannosylated Q derivatives galQ (**2**) and manQ (**3**) present in human cytosolic tRNA<sup>Tyr</sup> and tRNA<sup>Asp</sup>, respectively.

Galactosyl-Q **2** was constructed from three appropriately protected parts (Figure 2): The 7-formyl-7-deazaguanosine **6** was prepared, as reported by us, with Bz-protected hydroxyl groups at the ribose, and a pivaloylate protection group at the 2-amino residue.<sup>[14]</sup> The galactose sugar was introduced as a TBS- and 2-chloroisobutyryl-protected trichloroacetimidate **4**, and the cyclopentene unit **5** was used with Fmoc-protected allyl amine and a TBS-protected allylic alcohol. We choose the 2-chlorobutyryl protecting group for the sugar-donor **4** because of its bulkiness in order to avoid unwanted orthoester formation as the main product of the glycosylation reaction, a strategy reported by Szpilman et al.<sup>[15]</sup>

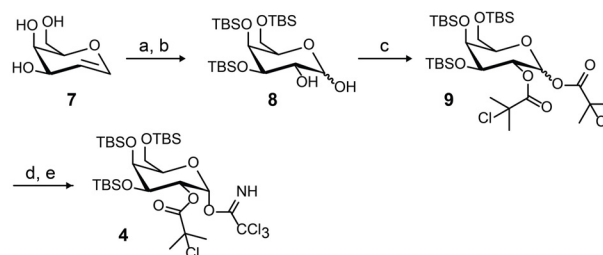


**Figure 2.** Retrosynthetic analysis for galQ **2**, showing the three key precursors **4**, **5**, and **6**.

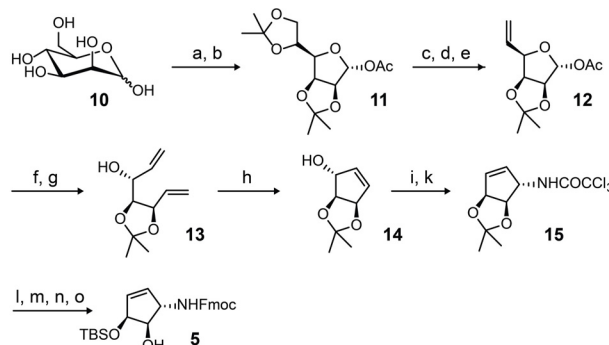
The galactosyl-donor **4** itself was prepared from D-galactal **7**, which was first TBS-protected (Scheme 1 A).<sup>[16]</sup> *cis*-Dihydroxylation of the double bond from the sterically less shielded side furnished compound **8**.<sup>[17]</sup> This step was followed by protection of the two newly introduced hydroxyl groups with 2-chloroisobutyric acid to give the galactose-donor precursor **9**. Deprotection of the anomeric hydroxyl group with hydrazine provided the galactose precursor with a free anomeric hydroxyl group which was subsequently converted into the trichloroacetimidate donor **4** using a standard procedure.

Scheme 1 B shows the synthesis of the protected 5(*S*)-amino-3(*S*),4(*R*)-dihydroxycyclopent-1-ene **5**. The starting point was mannose **10**,<sup>[18]</sup> which was converted as reported into the double-acetonide-protected mannofuranoside **11** with an acetyl-protected anomeric center in two steps. Selective cleavage of the acetonide protecting group at the primary hydroxyl group, followed by an orthoester-based elimination, allowed introduction of a terminal double bond (**12**). Anomeric deprotection, followed by a Wittig reaction, provided the precursor **13** for the ring-closing metathesis reaction. The free hydroxyl group in **14** was then the starting point for an Overman rearrangement, providing the amine protected as the trichloroacetamide-protected amine **15**.<sup>[19]</sup> Cleavage of this protecting group with NaOH was followed by Fmoc protection of the free amine using a standard proce-

#### A) Synthesis of the galactose precursor **4**



#### B) Synthesis of the cyclopentene precursor **5**

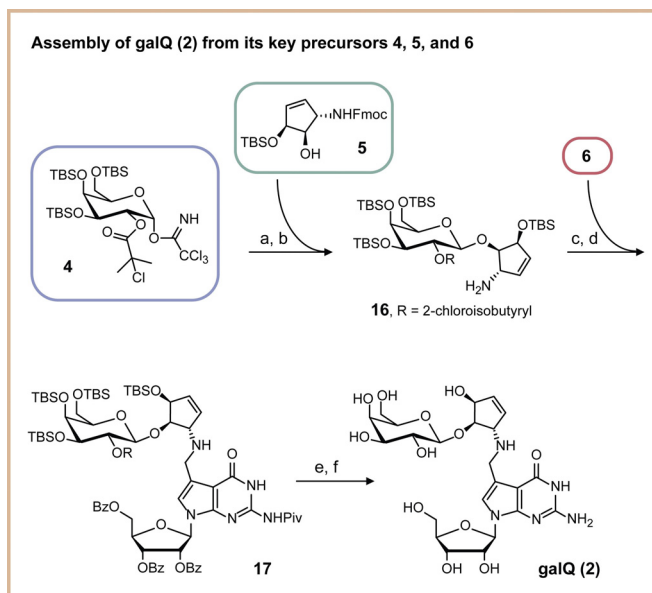


**Scheme 1.** Synthesis of the key precursors **4** and **5**. A) Synthesis of the galactose precursor **4**: a) TBSCl, imidazole, DMF, 55 °C, 2 d; b) K<sub>2</sub>OsO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, NMO, THF, *t*-BuOH, H<sub>2</sub>O, rt, 4 h; c) 2-chloroisobutyric acid, DIC, DMAP, 0 °C, 30 min → rt, 2 h; d) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·AcOH, DMF, −40 °C to rt, 3 h; e) Cl<sub>3</sub>CCN, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DCM, rt, 4 h. B) Synthesis of the cyclopentene precursor **5**: a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, *p*-TsOH, rt, 1 h; b) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, 0 °C → rt, 18 h; c) aq. AcOH (66 %), 55 °C, 4 h; d) triethylorthoformate, 100 °C, 30 min; e) Ac<sub>2</sub>O, 130 °C, 5 h; f) *t*-BuOK, MeOH, 20 min; g) NaH, DMSO, Ph<sub>3</sub>PMeBr, THF, rt → 68 °C, 2 h; h) Grubbs(I) catalyst, DCM, rt, 26 h; i) Cl<sub>3</sub>CCN, DBU, DCM, rt, 20 min; j) *o*-xylene, 150 °C, 5 h; k) NaOH, MeOH, rt, overnight; l) Fmoc-OSu, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 1,4-dioxane; m) AcOH, H<sub>2</sub>O, EtOAc, 50 °C, 24 h; n) TBSOTf, DMF, −55 °C, 15 min.

cedure. We finally opened the acetal and protected the allylic hydroxyl group selectively with TBS-OTf in DMF at −55 °C. In this reaction, the temperature is particularly important. When the reaction was performed at higher temperatures and with prolonged reaction times, we noted selective protection of the homoallylic position.

The assembly of the galQ nucleoside **2** from the precursors **4–6** is shown in Scheme 2. We first galactosylated the cyclopentene derivative **5**. This sterically demanding step was successfully achieved by activation of the trichloroacetimidate with 2-chloro-6-methylpyridinium triflate in dichloromethane at room temperature.<sup>[15,20]</sup> We achieved selective formation of the β-configured galactoside due to the neighboring-group effect. Subsequent cleavage of the Fmoc protection group gave product **16**, which was followed by a two-step reductive amination. First, the imine was formed in benzene, subsequently followed by reduction of the imine with NaBH<sub>4</sub> in methanol to afford protected galQ **17**. In a two-step deprotection protocol, we first removed the TBS groups with HF·NEt<sub>3</sub>, followed by cleavage of ester-type



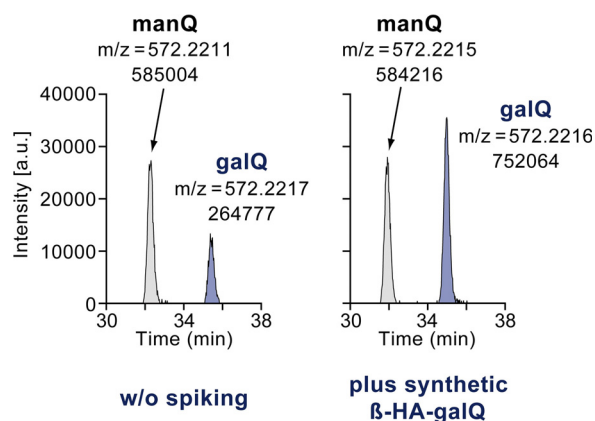


**Scheme 2.** Depiction of the galQ **2** assembly from the three key precursors **4**, **5**, and **6**. a) 2-Chloro-6-methylpyridinium triflate, DCM, rt, 2 h; b) DBU, MeCN, rt, 1.25 h; c) benzene, rt, 5 h; d) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0°C, 1 h; e) HF·NEt<sub>3</sub>, DCM, rt, 4 d; f) NaOMe, MeOH, rt, 2 d.

protecting groups under Zemplén conditions. For the cleavage of the pivaloyl amide protecting group, we needed to use 0.5 M NaOMe in methanol. This strategy provided the target compound **2** with an overall yield of 0.5 % in 20 linear steps from the mannose starting molecule for the cyclopentene unit. The synthesis provided a sufficient amount of material for all further investigations.

We next investigated whether our synthetic  $\beta$ -homoallylic galQ **2** is identical with the natural product, because analytical data available for galQ was very limited.<sup>[11]</sup> For this experiment, we isolated total RNA from mouse liver and performed an enzymatic digestion of the isolated RNA to the nucleoside level. This nucleoside mixture was analyzed by HPLC-MS. Indeed, under our HPLC conditions, we detected two signals with the appropriate  $m/z$  value for galQ and manQ in the extracted ion chromatogram with a retention time of around 32 and 35 min. No other peaks were present in the same  $m/z$  range. We next co-injected our synthetic  $\beta$ -homoallylic galQ **2**, which led to a marked increase of the second signal with a retention time of about 35 min (Figure 3). This result unambiguously showed that our synthetic compound galQ **2** and the co-eluting natural compound with the same mass are identical. Therefore, this natural compound is indeed a  $\beta$ -galactosylated Q derivative. Taken together, our experiment confirms the proposed chemical structure of galQ, in which the bond between the homoallylic hydroxyl group of queuosine and galactose is in  $\beta$ -configuration.

Having identified the HPLC retention time of galQ and therefore also of manQ, we finally were able to determine the absolute levels of galQ, manQ, and Q in different tissues of newborn (postnatal day 1; pd1) and adult mice (postnatal month 3; pm3). For an initial broad study, we measured the respective nucleoside levels in cortex, cerebellum, liver,



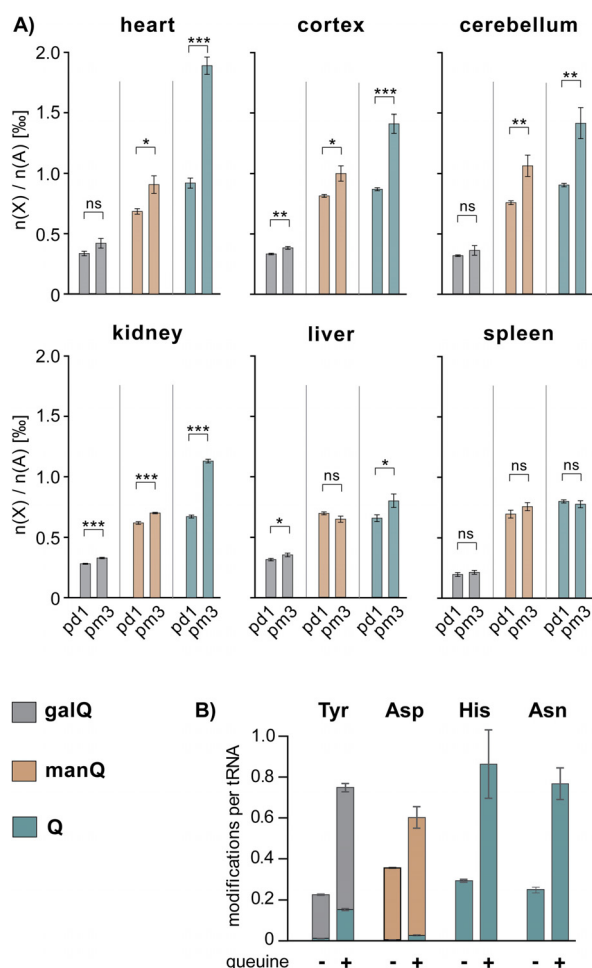
**Figure 3.** Results of a co-injection study confirming the identity of our synthetic  $\beta$ -homoallylic-galQ **2** and the natural product. Depicted are the extracted-ion chromatograms ( $m/z = 572.2148$ – $572.2248$ ) of two HPLC-MS analyses, either with (right) or without (left) prior spiking of the synthetic galQ **2**. The exact mass  $[M+H]^+$  of galQ (and manQ) is 572.2198 u, showing a perfect match to the two MS peaks observed by us with less than 4 ppm deviation.

kidney, heart, and spleen, using the same RNA isolation and digestion protocol as for the co-injection experiment (Figure 4A).

From our data it is clearly evident that the levels of all three modifications (galQ, manQ, and Q) generally increase with age. This effect is by far most pronounced with Q, while galQ and manQ only show a modest increase, if at all. Furthermore, and for all three modifications investigated, we see differences between the six organs at the same age. Heart, followed by brain tissues, contains the largest levels of Q and its sugar-modified derivatives, followed by kidney, liver, and spleen. In general, the changes of the modification levels observed by us positively correlate with the respective organ-specific protein-synthesis demands, as we have shown before.<sup>[7]</sup> Nevertheless, there are some prominent outliers. These outliers (e.g. heart tissue) seem to rather correlate with the organ-specific density of mitochondria. It was shown before that the Q-base in mitochondrial tRNA<sup>Tyr</sup> and tRNA<sup>Asp</sup> is not sugar-modified.<sup>[8]</sup> We therefore speculate that the organ-specific differences in the levels of galQ, manQ, and Q are due to a combination of two independent effects: The organ-specific protein-synthesis ratio and the organ-specific mitochondrial density.

It is well-established that for biosynthesis of Q (and its sugar-modified derivatives), eukaryotes have to take up the queuine base from their diet,<sup>[21,22]</sup> mammals thereby profiting from their gut microbiome.<sup>[23]</sup> We therefore speculate that the low levels of Q-family nucleosides in newborn mice observed here may be caused by a lack of queuine supply in newborn mice, which only later establish their microbiome. Furthermore, high rates of cell division and tissue development in young mice may cause additional queuine supply problems.

To further study the influence of queuine availability on Q-family modification levels, cell culture experiments were performed: Human embryonic kidney cells (HEK 293T) were grown either in culture medium supplemented with 20 nM queuine (enriched medium) or in medium without additional



**Figure 4.** A) Absolute levels of galQ **2**, manQ **3**, and Q **1** in six different organs of newborn (postnatal day 1, pd1) and adult (postnatal month 3, pm3) mice. Values are given as number of xQ modifications  $n(X)$  per 1000 adenosine nucleosides  $n(A)$ . Error bars represent the standard deviation of three biological replicates. For statistical analysis, Student's unpaired two-tailed t-test was used. n.s.: not significant, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ . B) Number of galQ, manQ, and Q modifications per cytosolic  $tRNA^{Tyr}$ ,  $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{His}$ , and  $tRNA^{Asn}$  from human HEK 293T cells, respectively. queuine+: cells grown in queuine-enriched medium, queuine-: cells grown in standard medium. Values are given as average number of modifications per tRNA molecule. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

queuine (standard medium). Queuine is the substrate of the TGT enzyme, which performs the exchange of a guanine base by the queuine heterocycle during tRNA maturation.<sup>[24–26]</sup> From both cell populations, cytosolic  $tRNA^{Tyr}$ ,  $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{His}$ , and  $tRNA^{Asn}$  were isolated and digested to the nucleoside level. For each of these four individual tRNA species, the number of galQ, manQ, and Q modifications per tRNA was then determined by a mass-spectrometry-based isotope-dilution method using the reference compound synthesized here (see the Supporting Information).

Indeed, our data show that the extent of Q-modification in the wobble position of cytosolic  $tRNA^{Tyr}$ ,  $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{His}$ , and  $tRNA^{Asn}$  is strongly dependent on queuine availability (Figure 4B).<sup>[24]</sup> In the case of  $tRNA^{Tyr}$  (galQ),  $tRNA^{His}$ , and

$tRNA^{Asn}$  (Q), the difference in modification extent between cells grown in enriched versus standard medium is threefold, while for  $tRNA^{Asp}$  (manQ) it is 1.7 fold. These results are well in line with our hypothesis and might therefore explain the lower modification levels in newborn mice. Of note, in all of our experiments even a sufficient queuine supply did not lead to fully modified tRNAs. This might again be an indication of the modification machinery lagging behind the de novo synthesis of tRNA in highly proliferating cells.

Furthermore, we detected a Q-only-modified  $tRNA^{Tyr}$  form in our experiments lacking the galactose sugar, while  $tRNA^{Asp}$  was always found to be either modified with manQ or completely unmodified. It seems that, in our experimental setup, mannosylation of  $tRNA^{Asp}$  may be more tightly connected to G/Q-exchange than the galactosylation of Q-only-bearing  $tRNA^{Tyr}$ . Testing this exciting hypothesis is an interesting starting point for future studies.

In summary, we here report the first total synthesis of the human natural product galactosyl-queuosine **2**. Our synthetic material allowed us to confirm the proposed galQ structure by direct comparison with natural material, and we show that this hypermodified nucleoside is present in all tissues of newborn and adult mice. We furthermore report the absolute levels of all three Q-family members in six different mouse organs and in human cytosolic tRNAs. Taken together, our results confirm the crucial importance of tRNA galQ and manQ modification.

## Acknowledgements

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) -Project-ID 255344185 – SPP 1784; Project-ID 325871075 – SFB 1309, and Project-ID 393547839 – SFB 1361. This project has received additional funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 765266 (LightDyNAMics) and from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 741912 (EPiR).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** galactosylation · mannosylation · mannosyl-queuosine · queuosine · RNA modifications

- [1] P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach, A. Kotter, M. Helm, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D303–D307.
- [2] F. Harada, S. Nishimura, *Biochemistry* **1972**, *11*, 301–308.
- [3] H. Kasai, Y. Kuchino, K. Nihei, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 1931–1940.
- [4] H. Grosjean, M. Sprinzl, S. Steinberg, *Biochemie* **1995**, *77*, 139–141.

- [5] A. Costa, J.-P. Pais de Barros, G. Keith, W. Baranowski, J. Desgrès, *J. Chromatogr. B* **2004**, *801*, 237–247.
- [6] D. Globisch, D. Pearson, A. Hienzsch, T. Brückl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. C. Kneuttinger, M. Müller, S. A. Sieber, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9739–9742; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9913–9916.
- [7] C. Brandmayr, M. Wagner, T. Brückl, D. Globisch, D. Pearson, A. C. Kneuttinger, V. Reiter, A. Hienzsch, S. Koch, I. Thoma, P. Thumbs, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11162–11165; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11324–11328.
- [8] T. Suzuki, T. Suzuki, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 7346–7357.
- [9] N. Okada, N. Shindo-Okada, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 415–423.
- [10] N. Okada, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 2931–2937.
- [11] H. Kasai, K. Nakanishi, R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, Z. Ohashi, J. A. McCloskey, H. J. Gross, S. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5044–5046.
- [12] T. Ohgi, T. Kondo, T. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3629–3633.
- [13] T. Kondo, K. Okamoto, T. Ohgi, T. Goto, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 207–213.
- [14] F. Klepper, E.-M. Jahn, V. Hickmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2325–2327; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2377–2379.
- [15] A. M. Szpilman, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1305–1307.
- [16] D. Crich, T. J. Ritchie, *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, C3–C6.
- [17] U. P. Singhi, R. K. Brown, *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 1179–1186.
- [18] D. Vonlanthen, C. J. Leumann, *Synthesis* **2003**, 1087–1090.
- [19] H. Ovaa, B. Lastdrager, J. D. C. Codée, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. H. van Boom, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 2370–2377.
- [20] A. M. Szpilman, J. M. Manthorpe, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4339–4342; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4411–4414.
- [21] J. P. Reyniers, J. R. Pleasants, B. S. Wostmann, J. R. Katze, W. R. Farkas, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11591–11594.
- [22] J. R. Katze, B. Basile, J. A. McCloskey, *Science* **1982**, *216*, 55–56.
- [23] W. R. Farkas, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 6832–6835.
- [24] N. Okada, F. Harada, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3*, 2593–2604.
- [25] N. Shindo-Okada, N. Okada, T. Ohgi, T. Goto, S. Nishimura, *Biochemistry* **1980**, *19*, 395–400.
- [26] C. Boland, P. Hayes, I. Santa-Maria, S. Nishimura, V. P. Kelly, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18218–18227.
- [27] F. Tuorto, C. Legrand, C. Cirzi, G. Federico, R. Liebers, M. Müller, A. E. Ehrenhofer-Murray, G. Dittmar, H.-J. Gröne, F. Lyko, *EMBO J.* **2018**, *37*, e99777.

Manuscript received: February 14, 2020

Accepted manuscript online: March 11, 2020

Version of record online: April 21, 2020



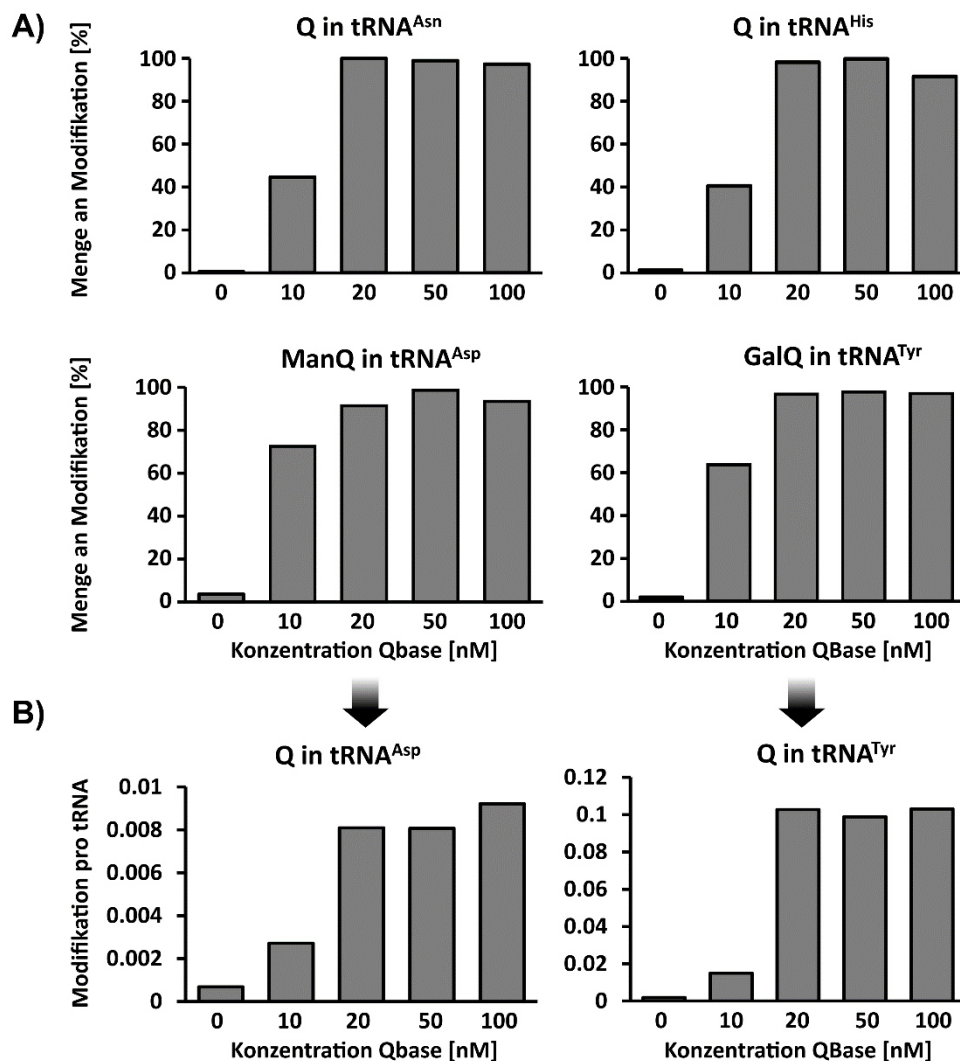
### 3.4.1 Auswirkungen von Queuin-Supplementierung in Zellkultur

In Thumbs *et al.* (*Angewandte Chemie*, 2020) wurden HEK-293-Zellen mit Queuin, der Nukleobase des Nukleosids Queuosin (Q) gefüttert, um festzustellen wie sich die Zufütterung auf die Abundanz der Q-Modifikationen Queuosin, Mannosyl-Queuosin (ManQ) und Galaktosyl-Queuosin (GalQ) auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass in Standard-Zellkulturmedium (DMEM D6546 – siehe **Kapitel 5.1 Materialien**) mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) eine Zufütterung von Queuin zu einem Anstieg der respektiven Q-Modifikationen führt. Absolute Mengen an Q-Modifikationen bei Zufütterung von Queuin wurden auf  $\sim 0,8$  Q pro tRNA<sup>His</sup><sub>GUG</sub> bzw.  $\sim 0,75$  Q pro tRNA<sup>Asn</sup><sub>GUU</sub> bestimmt. Die Menge an GalQ beträgt  $\sim 0,75$  Modifikationen pro tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub>, die Menge von ManQ  $\sim 0,6$  pro tRNA<sup>Asp</sup><sub>GUC</sub>. Aufgrund fehlenden Standards wurde die Menge von ManQ über den synthetisierten GalQ-Standard berechnet und kann durch abweichende Ionisierungs- und Detektionseffizienz bei der Nukleosid-MS somit verfälscht sein. Aufgrund beobachteter Degradations-Prozesse von GalQ in der verdünnten wässrigen Kalibrier-Stocklösung wurde im folgenden Abschnitt auf die absolute Quantifizierung der Q-Modifikationen größtenteils verzichtet. Stattdessen sollen die relativen Unterschiede zwischen Proben näher betrachtet werden.

In einem initialen Experiment wurde die Konzentration an Queuin ermittelt, welche dem Zellkulturmedium zur vollständigen Modifizierung der respektiven Positionen zugegeben werden muss. Das Experiment wurde in Standard-Medium mit 10 % dialysiertem FBS durchgeführt. Durch die Dialyse wird Queuin, wie auch andere kleine Metaboliten, aus FBS entfernt und somit sichergestellt, dass das Ergebnis nicht durch das, im FBS normalerweise enthaltene Queuin verfälscht wird. Als Start-Kultur dienten Zellen, welche zuvor für mindestens 7 Tage ohne zusätzliche Queuin-Supplementierung in Medium mit dialysiertem FBS kultiviert wurden. Nach Kultivierung der Zellen für 2 Tage im entsprechenden Medium mit Queuin-Konzentrationen zwischen 0–100 nM wurde die RNA isoliert und einzelne tRNA-Isoakzeptoren aufgereinigt. Bei 20 nM scheint die maximale Menge an Q-Modifikationen erreicht zu sein (**Abbildung 3.10 A**). Lediglich für ManQ ist ein minimaler Anstieg bei 50 nM zu verzeichnen. Dieser entfällt bei der Verwendung von 100 nM jedoch wieder und kann demnach ebenso ein Artefakt der einmaligen Durchführung des Experiments sein. In einem späteren Experiment wird zudem gezeigt, dass eine Kultivierungsdauer von 2 Tagen im entsprechenden Medium für die volle Modifizierung der jeweiligen Positionen ausreichend ist (**Abbildung 3.15**), und diese daher keinen Einfluss auf die hier ermittelten Ergebnisse zeigen sollte.

### 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle

Interessanterweise ist in tRNA<sup>Asp</sup> (ManQ) und tRNA<sup>Tyr</sup> (GalQ) ebenso ein Anstieg von Q abhängig von der gewählten Konzentration zu erkennen (**Abbildung 3.10 B**). Dies lässt darauf schließen, dass geringe Mengen dieser tRNA-Isoakzeptoren durch eine Q-Modifikation ohne zusätzliche Zucker-Gruppe modifiziert sind. Dies war zu erwarten, da die jeweilige Zucker-Gruppe erst nach Einbau von Q an Position 34 der tRNA durch Hexose-Transferasen – in diesem Fall tRNA-Queuin-Glycosyltransferasen – auf die Q-Modifikationen übertragen werden.<sup>160, 287</sup> Ein Vergleich der absoluten Mengen zwischen beiden tRNA-Isoakzeptoren deutet darauf hin, dass dieser Effekt für tRNA<sup>Tyr</sup> weitaus ausgeprägter ist. So wird in tRNA<sup>Tyr</sup> ~ 10× mehr Q pro tRNA-Molekül detektiert als in tRNA<sup>Asp</sup>. Entweder ist die weitere Modifizierung der Q34 Modifikation in tRNA<sup>Asp</sup> höher priorisiert als die, der Q34 Modifikation in tRNA<sup>Tyr</sup>

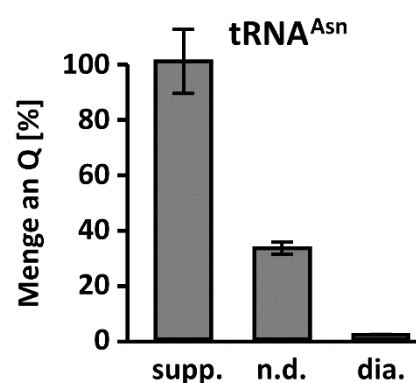


**Abbildung 3.10: Konzentrationsbestimmung der Queuine-Zufütterung.** (A) Der Anstieg von Queuosin in tRNA<sup>Asn</sup> und tRNA<sup>His</sup> und von ManQ bzw. GalQ in tRNA<sup>Asp</sup> bzw. tRNA<sup>Tyr</sup> nach Zugabe von Queuin. 100 % entsprechen dem höchsten Wert, der im jeweiligen tRNA-Isoakzeptor in diesem Experiment gemessen wurde. (B) Anstieg von Q in tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Tyr</sup> nach Zugabe von Queuin. In beiden tRNA-Isoakzeptoren ist bekannt, dass Q zusätzlich durch Mannose (tRNA<sup>Asp</sup>) bzw. Galaktose (tRNA<sup>Tyr</sup>) modifiziert ist.



oder für die initiale Modifizierung der Position 34 in tRNA<sup>Asp</sup> durch Q wird mehr Zeit benötigt als für die äquivalente Modifizierung in tRNA<sup>Tyr</sup>. Beide Szenarien würden zu einer niedrigeren Menge an Q in tRNA<sup>Asp</sup> führen.

Des Weiteren wurde getestet wie sich die Auswahl von FBS – dialysiert oder nicht – auf die Abundanz der Q-Modifikationen auswirkt. Zellen wurden in drei verschiedenen Medien kultiviert: i) Standard-Medium mit normalem FBS und 50 nM zusätzlichem Queuin, ii) Standard-Medium mit normalem FBS ohne zusätzliche Queuin-Supplementierung und iii) Standard-Medium mit dialysiertem FBS ohne zusätzliche Queuin-Supplementierung. Im Vergleich zu 50 nM supplementiertem Medium fällt auf, dass Zellen aus Standard-Zellkulturmedium ohne zusätzliche Queuin-Supplementierung in etwa 30 % der Modifizierung aufzeigen (**Abbildung 3.11**). Dies entspricht dem Level, welches ebenfalls bei einer Zugabe von etwa 10 nM Queuin detektiert werden konnte. In etwa diese Konzentration scheint bei der Zugabe von nicht dialysiertem FBS im Zellkulturmedium vorhanden zu sein. Bei der Verwendung von dialysiertem FBS sind nahezu keine Signale der Q-Modifikationen zu detektieren. Queuin ist also nicht, oder in zu geringen Mengen in dialysiertem FBS enthalten. Lediglich für ManQ ist noch ein minimales Level quantifizierbar. Eventuell werden für die Inkorporation von ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> geringe Mengen an Queuin recycelt und erneut verwendet. Erst nach Kultivierung über mehrere Passagen würde das Level allmählich abnehmen (hier: 10 Tage, 4 Passagen). Dies würde, wie bereits zuvor vermutet, für eine Priorisierung der ManQ-Modifikation gegenüber den anderen Q-Modifikationen sprechen.



**Abbildung 3.11: Queuin-Konzentration in nicht dialysiertem FBS.** Vergleich der Zufütterung von Queuin (supp.) mit Medien, welche lediglich mit dialysiertem (dia.) oder nicht dialysiertem (n.d.) FBS supplementiert wurden am Beispiel Queuosin in tRNA<sup>Asn</sup>. Die Balken geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von n = 3 biologischen Replikaten wieder.

Für die volle Modifizierung der entsprechenden Positionen sollte dem Medium in jedem Fall Queuin supplementiert werden. Während in der Publikations-Studie dem Medium Standard-FBS (nicht dialysiert) und 20 nM Queuin supplementiert wurde, sind alle folgenden Studien – falls nicht anders vermerkt – unter Supplementierung von 50 nM Queuin durchgeführt worden. Die höhere Konzentration an Queuin soll eine volle Modifizierung der entsprechenden tRNA-Moleküle sicherstellen.

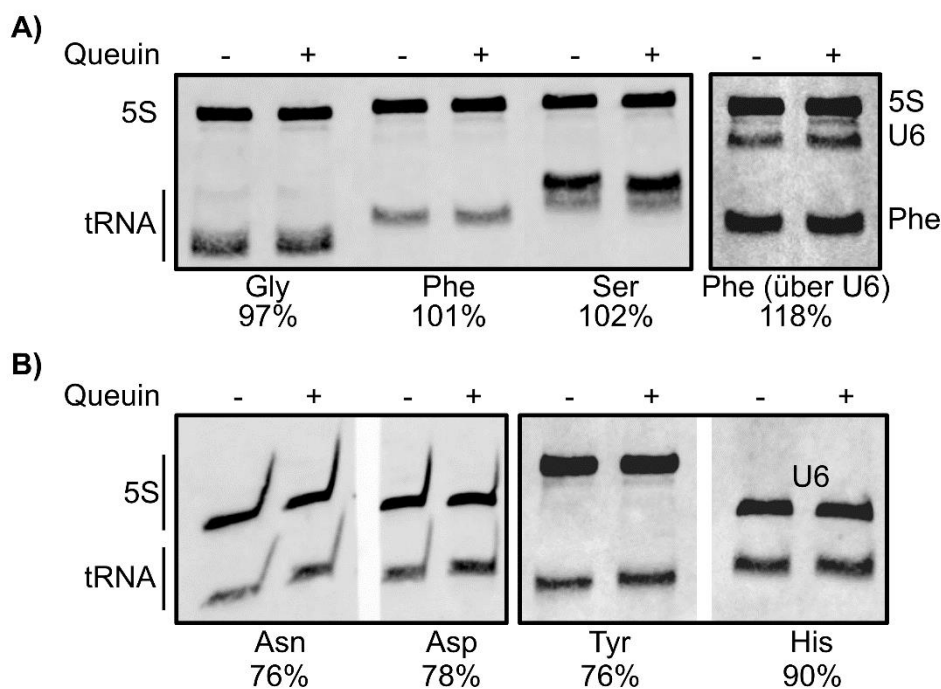
### 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle

Da die Modifizierung ein elementarer Schritt in der Prozessierung von tRNA-Isoakzeptoren ist, sollte untersucht werden, ob sich die Abundanz der tRNA-Isoakzeptoren abhängig von der Queuin-Supplementierung ändert. Ein Mangel an Queuin im Wachstumsmedium und eine damit verbundene Reduzierung der Q-Modifikationen könnte Einfluss auf den allgemeinen Reifungsprozess der tRNA-Isoakzeptoren haben. Zellen wurden in Standard-Medium mit 10 % dialysiertem FBS je in Abwesenheit und unter Supplementierung von 50 mM Queuin kultiviert. Je 1 µg Gesamt-RNA wurde über ein TBE-Harnstoff-Gel (12 % Polyacrylamid) aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Membran wurden die tRNA-Isoakzeptoren durch die eigens hierfür synthetisierten Detektionssonden nachgewiesen (~ 30mer revers komplementäre DNA Oligonukleotide gekoppelt mit dem Cyanin-Farbstoff Cy3). 5S rRNA diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung bei der Berechnung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz verwendet. Eine Alternative zu 5S rRNA stellt U6 snRNA dar. Beide RNA-Moleküle sollten konstitutiv transkribiert werden und daher als sogenannte Haushalts-RNA (engl.: housekeeping RNA) geeignet sein. Die Eignung beider RNA-Moleküle wird im folgenden Abschnitt ebenfalls analysiert.

Die Isoakzeptoren  $\text{tRNA}^{\text{Gly}}_{\text{GCC}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{GAA}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$  enthalten keine Q-Modifikation. Wie erwartet ändert sich die Abundanz abhängig von der Zufütterung von Queuin nicht maßgeblich (**Abbildung 3.12 A**). Ausschließlich bei der Verwendung von U6 snRNA als Haushalts-RNA zeigt sich für  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{GAA}}$  ein Anstieg der Abundanz, wenn Queuin dem Medium entzogen wird. Während es möglich erscheint, dass dies eine Reaktion der Zelle auf das Fehlen von Queuin im Medium ist, kann ebenso die Abundanz von U6 snRNA aufgrund zellulärer Mechanismen beeinflusst sein. Somit wäre U6 snRNA – wider Erwarten – nicht als Haushalts-RNA geeignet.

Die Isoakzeptoren  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{GUA}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Asp}}_{\text{GUC}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{His}}_{\text{GUG}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}_{\text{GUU}}$ , welche allesamt eine Q-Modifikation tragen, weisen bei der Normalisierung über 5S rRNA eine Reduzierung in Queuin-mangelndem Medium auf. (**Abbildung 3.12 B**). Für  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{GUA}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Asp}}_{\text{GUC}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}_{\text{GUU}}$  entspricht dies einer Reduzierung von 22–24 %. Aufgrund erheblich geringerer Intensität des Signals, musste für  $\text{tRNA}^{\text{His}}_{\text{GUG}}$  auf die Normalisierung über U6 snRNA zurückgegriffen werden. Hier wurden 7,5 µg geladen, was zu einer Übersättigung des 5S rRNA Signals führen würde. Wie schon zuvor resultiert die Quantifizierung über U6 snRNA in vergleichsweise höheren Werten. Wird davon ausgegangen, dass die Quantifizierung über U6 snRNA fehlerhaft ist, lässt sich dieser Fehler anhand der unterschiedlichen  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  Ergebnisse berechnen und beträgt ~ 17 %. Wird dieser als Korrektur auf  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  angewandt, ergibt

sich dort ein Wert von 77 %. Dies liegt exakt im Bereich der anderen Q-abhängigen tRNA-Isoakzeptoren. Ein systematischer Fehler wird demnach entweder durch die Verwendung von 5S rRNA oder von U6 snRNA eingeführt. In beiden Fällen ist jedoch die Abundanz der Isoakzeptoren  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{Tyr}$  und  $tRNA^{His}$  im Vergleich zu den anderen tRNA-Isoakzeptoren verringert. Bei genauer Betrachtung kann mit bloßem Auge trotz gleicher Auftragsmenge an Gesamt-RNA beim Fehlen von Queuin für die Queuin-abhängigen tRNA-Isoakzeptoren ein Verlust der Signalintensität erkannt werden. Da die Ergebnisse bei Normalisierung über 5S rRNA daher eher den Erwartungen entsprechen, sollte die Verwendung von U6 snRNA für zukünftige Experimente kritisch betrachtet werden.



**Abbildung 3.12: Northern-Blot-Analyse der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz in Abhängigkeit von Queuin.** Auf ein 12% TBE-Harnstoff-Gel wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA (7,5 µg für Analyse von  $tRNA^{His}$ ) aufgetragen. Verglichen wird RNA aus Zellen welche unter Zugabe von 50 nM Queuin (QBase) kultiviert wurden (+) mit RNA aus Zellen, welche ohne Queuin kultiviert wurden (-). Für die Herstellung beider Medien wurde dialysiertes FBS verwendet. Normalisiert wurde jeweils auf 5S rRNA (bzw. auf U6 snRNA für  $tRNA^{His}$  und testweise für  $tRNA^{Phe}$ ). Die Abundanz der tRNA-Isoakzeptoren im Medium ohne QBase im Vergleich zur Abundanz in Medium mit Queuin ist als Prozentzahl unter den jeweiligen tRNA-Isoakzeptoren angegeben. (A) Links: Drei tRNA-Isoakzeptoren ( $tRNA^{Gly}$ ,  $tRNA^{Phe}$ ,  $tRNA^{Ser}$ ) in denen keine Q-Modifikation eingebaut wird. Rechts: Zusätzliche Quantifizierung von  $tRNA^{Phe}$  über U6 snRNA. (B) Die vier tRNA-Isoakzeptoren in denen die Q-Modifikationen Q ( $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{His}$ ), ManQ ( $tRNA^{Asp}$ ) und GalQ ( $tRNA^{Tyr}$ ) vorzufinden sind.

#### 3.4.2 Effekt von Queuosin auf andere Modifikationen

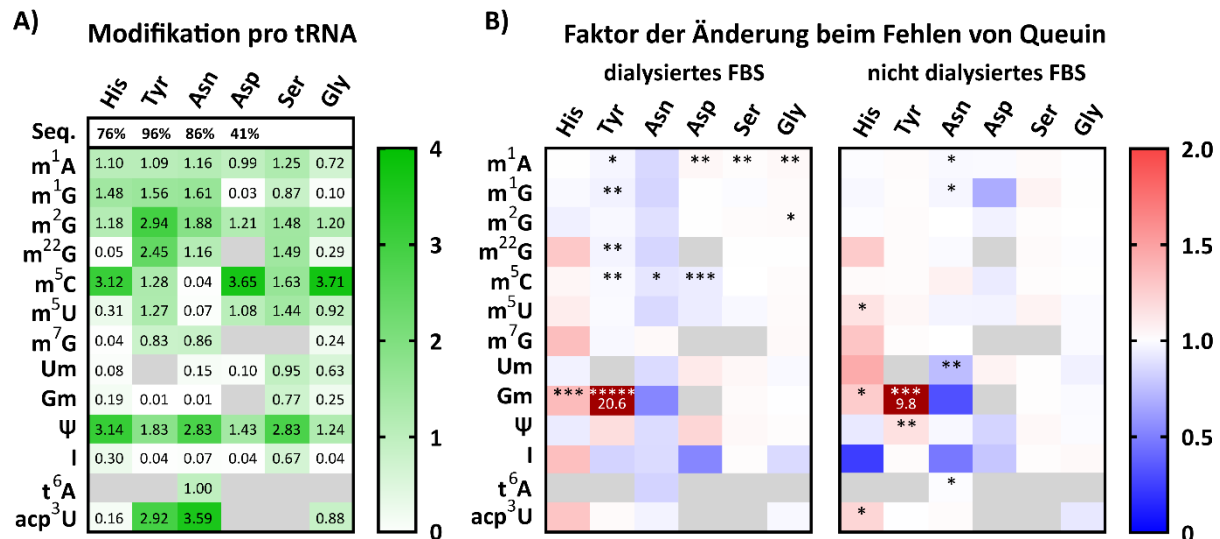
Im Anschluss sollte untersucht werden, wie sich die Supplementierung von Queuin, und der damit verbundene Einbau der Q-Modifikationen auf andere Modifikationen der jeweiligen tRNA-Isoakzeptoren auswirkt. Zellen wurden in Standard-Medium mit normalem oder dialysiertem FBS kultiviert. Beide Varianten wurden je mit oder ohne zusätzliche Supplementierung von 50 nM Queuin kultiviert. Nach 10 Tagen wurde die RNA isoliert, die tRNA-Isoakzeptoren aufgereinigt und über Nukleosid-MS analysiert. Neben den bereits zuvor analysierten tRNA-Molekülen wurden ebenso die Isoakzeptoren tRNA<sup>Ser</sup><sub>UGA</sub> und tRNA<sup>Gly</sup><sub>GCC</sub> aufgereinigt und analysiert. Absolute Werte für alle analysierten Modifikationen, inklusive Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten können **Tabelle S3** entnommen werden.

Aus Gründen der Überschaubarkeit wurde für den folgenden Abschnitt eine Auswahl aus den insgesamt 24 analysierten Modifikationen getroffen. Diese bezieht Modifikationen ein, welche häufig in den tRNA-Isoakzeptoren vertreten sind und/oder solche, die eine starke Änderung abhängig von der Verfügbarkeit von Queuin aufzeigen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3.13 A** in Form einer Heatmap, welche als Tabelle interpretiert werden kann, aufgelistet. Je stärker (grün) eine Modifikation in dieser Tabelle eingefärbt ist, desto häufiger deren Auftreten im jeweiligen tRNA-Isoakzeptor. So fällt direkt auf, dass m<sup>5</sup>C und Ψ die beiden am häufigsten vertretenen Modifikationen sind. Für acp<sup>3</sup>U sind die Werte wider Erwarten ebenfalls sehr hoch. Eine plausible Erklärung wäre die fehlerhafte Quantifizierung aufgrund falscher Konzentration der verwendeten Kalibrierlösung, welche wiederum auf Degradationsprozesse oder falsche Einwaage (bedingt durch minimale Salzreste im aufgereinigten Produkt) zurückgeführt werden kann. Nichtsdestotrotz können relative Unterschiede zwischen Proben problemlos analysiert werden. Ein ähnlicher Effekt ist für m<sup>2</sup>G zu beobachten. Dieses Problem fiel schon zuvor bei anderen Experimenten auf, konnte aufgrund des Mangels an alternativen Herstellern bisher aber nicht gelöst werden. Alle weiteren Modifikationen liegen im erwarteten Bereich (modomics).<sup>10</sup>

Um die korrekte Quantifizierung der Modifikationsmenge in den einzelnen tRNA-Isoakzeptoren zu gewährleisten ist eine erfolgreiche Aufreinigung essenziell. Die Reinheit der tRNA-Isoakzeptoren wurde über Sequenzierung bestimmt. Die Reinheit von tRNA<sup>Tyr</sup> konnte auf 96 % bestimmt werden. tRNA<sup>Asn</sup> weist mit 86 % ebenfalls einen hohen Grad an Reinheit auf. Verunreinigungen sind größtenteils tRNA<sup>Lys</sup><sub>CTT</sub> (7 %) und tRNA<sup>Arg</sup><sub>CCT/CCG</sub> (2 %). In aufgereinigter tRNA<sup>His</sup> konnten tRNA<sup>Glu</sup><sub>GTC/TTC</sub> (9 %) und tRNA<sup>Gly</sup><sub>CCC/GCC</sub> (12 %) nachgewiesen werden; die Menge an tRNA<sup>His</sup> wurde mit 76 % bestimmt. tRNA<sup>Asp</sup> ist durch tRNA<sup>Gly</sup><sub>CCC/GCC</sub> (51 %) und tRNA<sup>Glu</sup><sub>GTC/TTC</sub> (4 %) verunreinigt und konnte somit nur zu 41% angereichert werden. Dies

wird auch durch die hohe Vergleichbarkeit der Modifikationsmengen in tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Gly</sup> verdeutlicht. Insbesondere die Interpretation der Daten dieser beiden tRNA-Isoakzeptoren sollte daher kritisch betrachtet werden. Da in tRNA<sup>Ser</sup> und tRNA<sup>Gly</sup> keine Q-Modifikation inkorporiert wird und diese daher nur der Kontrolle dienen, wurde die Reinheit dieser tRNA-Isoakzeptoren nicht bestimmt.

Bei den Änderungen, die sich ergeben, wenn dem Medium Queuin entzogen wird, fällt direkt auf, dass das Modifikationsprofil in tRNA<sup>Ser</sup> und tRNA<sup>Gly</sup> vergleichsweise stabil ist (**Abbildung 3.13 B**). Da in beiden tRNA-Isoakzeptoren keine Q-Modifikationen berichtet sind war dies zu erwarten. Statistisch signifikante Änderungen, wie sie für m<sup>1</sup>A und m<sup>2</sup>G zu beobachten sind, bewegen sich im sehr geringen Bereich. Eine allgemeine Adaption der Zelle auf das Fehlen von Queuin könnte der Auslöser hierfür sein. Im Folgenden soll auf die stärker ausgeprägten Effekte in den Queuin-abhängigen tRNA-Isoakzeptoren eingegangen werden. Bei diesen fällt beispielsweise direkt eine deutliche Änderung der Abundanz von I auf, allerdings ohne das Vorhandensein einer statistischen Signifikanz. Die Menge an I in den meisten tRNA-Isoakzeptoren ist sehr gering. Daher erscheint es plausibel, dass gewisse Mengen an I durch Schäden in der Zelle, aber hauptsächlich durch spontane Desaminierung während der RNA-Aufreinigung



**Abbildung 3.13: Änderung von Modifikationen, beim Fehlen von Queuin im Medium.** (A) Absolute Mengen detektierter Modifikationen in Zellen aus Standard-Medium supplementiert mit nicht dialysiertem FBS und 50 nM Queuin. Je dunkelgrüner das Feld, desto höher die Menge an Modifikation. Messwerte geben den Mittelwert aus n = 3 biologischen Replikaten wieder. In der obersten Zeile (Seq.) ist die mittels Sequenzierung bestimmte Reinheit der tRNA-Isoakzeptoren angegeben. (B) Faktor der Änderung, wenn dem Medium kein Queuin zugegeben wird. Links: Effekt mit dialysiertem FBS, rechts: Effekt mit nicht dialysiertem FBS. Der Faktor wurde aus den Mittelwerten von n = 3 biologischen Replikaten ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde über einen homoskedastischen, zweiseitigen *t*-Test ermittelt. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\*\* = p < 0,00001

und dem enzymatischen Verdau entstehen. Diese Änderungen sind höchstwahrscheinlich Artefakte, welche unabhängig von der Supplementierung von Queuin sind.

In tRNA<sup>His</sup> scheinen auf den ersten Blick viele Modifikationen eine Reaktion auf das Fehlen von Queuin zu zeigen. Modifikationsmengen werden vorwiegend hochreguliert, erneut befinden sich diese Änderungen jedoch nicht im statistisch signifikanten Bereich. Besonders ausgeprägt sind diese Änderungen für Modifikationen, welche eine geringe Abundanz aufweisen (0,04–0,31 Modifikationen pro tRNA). Einzig Gm, welches sich in nur 19 % der Fälle in tRNA<sup>His</sup> befindet, zeigt einen statistisch signifikanten Anstieg beim Fehlen von Queuin im Zellkulturmedium. Dieses Phänomen kann ebenfalls in tRNA<sup>Tyr</sup> beobachtet werden. Während die meisten Modifikationen hier minimal, jedoch signifikant geringere Level beim Fehlen von Queuin aufweisen, kann für Gm in Medium mit dialysiertem FBS eine 20× höhere Menge nachgewiesen werden. In Medium mit normalem FBS ist dieser Effekt mit einer ~ 10× höheren Menge zwar nicht so stark ausgeprägt, allerdings immer noch auffallend signifikant. Dass der Effekt bei der Verwendung von nicht dialysiertem FBS absinkt, kann außerdem durch folgende Hypothese erklärt werden: Die nicht vorhandene Supplementierung von Queuin im entsprechenden Medium wird zum Teil von den geringen Mengen an Queuin in normalem FBS (~10 nM, siehe vorheriges Kapitel) kompensiert. Dies manifestiert sich in einer partiellen Anpassung der Modifikationsmenge von Gm. Diese Beobachtung spricht für die Tatsache, dass das Vorhandensein von Queuin einen direkten Einfluss auf die anderen Modifikationen, in diesem Fall speziell auf Gm hat.

Mit ~ 0,1 Gm pro tRNA<sup>Tyr</sup> befindet sich diese Modifikation zwar allgemein in einem sehr geringen Bereich, ohne große Zweifel kann aber davon ausgegangen werden, dass dies eine molekulare Reaktion der Zelle auf den Mangel von Queuin im Medium ist. So könnte Gm beispielsweise einen entscheidenden Einfluss auf die Inkorporation von Queuosin haben und würde demnach erst nach vollständiger Modifizierung von tRNA<sup>Tyr</sup> entfernt werden. Eine weitere Hypothese wäre der Einbau von Gm als Kompensation zum Fehlen von Queuosin in tRNA<sup>Tyr</sup> oder sogar die weitere Modifizierung von Gm zu GalQm. Bei Anwesenheit von Queuin im Zellkulturmedium könnte Gm, aufgrund der weiteren Modifizierung zu GalQm demnach kaum detektiert werden.

Weitere Effekte in tRNA<sup>Tyr</sup> sind die Verringerung der Modifikationen m<sup>1</sup>G, m<sup>22</sup>G und m<sup>5</sup>C. Alle drei weisen eine gewisse statistische Signifikanz auf, die Änderung sind mit 3–5 % allerdings sehr gering und nicht mit dem Ausmaß der Änderung von Gm zu vergleichen. Zudem sind diese Effekte ausschließlich bei der Verwendung von dialysiertem FBS zu beobachten. Im



Gegensatz dazu ist ein statistisch signifikanter Anstieg von  $\Psi$  lediglich bei der Verwendung von nicht dialysiertem FBS zu erkennen. In dialysiertem FBS ist die Abweichung zwischen den einzelnen Replikaten zu groß.

Eine allgemeine Reduktion der Modifikationsdichte bei Fehlen von Queuin im Medium weist tRNA<sup>Asn</sup> auf. Die einzig statistisch signifikante Änderung einer Modifikation ist erneut die einer Ribose-methylierten, nämlich Um. Diese ist in 15 % der tRNA<sup>Asn</sup> Moleküle vorzufinden und damit erneut eher selten. Die meisten Ribose-methylierten Modifikationen befinden sich, ebenso wie die Q-Modifikationen, in der Anticodon-Schleife. Eine direkte Abhängigkeit dieser Modifikationen von Queuin erscheint also plausibel. Der auffälligste Wert in tRNA<sup>Asp</sup> ist die Änderung von m<sup>5</sup>C. Ein Zusammenhang zwischen ManQ34 in tRNA<sup>Asp</sup> und m<sup>5</sup>C38 konnte schon zuvor festgestellt werden.<sup>23, 24</sup> Bei Fehlen der ManQ34-Modifikation wurde ein geringeres Level an m<sup>5</sup>C38 nachgewiesen. Interessant ist, dass der Effekt lediglich in Medium mit dialysiertem FBS statistisch signifikant ist. Bereits kleine Mengen an Queuin im Medium, wie sie in normalem FBS vorhanden sind, scheinen ausreichend zu sein, um eine volle Modifizierung von m<sup>5</sup>C38 zu induzieren. Wie zuvor gezeigt sind diese Mengen für die vollständige Modifizierung von ManQ34 allerdings nicht ausreichend und es werden lediglich ~ 75 % erreicht (**Abbildung 3.10 C/D**). Wie durch Sequenzierung bestimmt wurde, beträgt der Anteil von tRNA<sup>Asp</sup> in der analysierten Probe lediglich 41 %, während tRNA<sup>Gly</sup> zu 51 % enthalten ist. In tRNA<sup>Gly</sup> wurde ebenfalls m<sup>5</sup>C38 und zusätzlich drei weitere m<sup>5</sup>C-Modifikationen in der variablen Schleife berichtet. Aufgrund des Fehlens einer Q-Modifikation kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Inkorporation von m<sup>5</sup>C38 und aller weiteren m<sup>5</sup>C-Modifikationen in tRNA<sup>Gly</sup> unabhängig von der Zufütterung von Queuin ist. Ein stetig hohes Level an m<sup>5</sup>C in tRNA<sup>Gly</sup> könnte den beobachteten Effekt in tRNA<sup>Asp</sup> daher geringer erscheinen lassen. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser, bei besserer Aufreinigung von tRNA<sup>Asp</sup> somit stärker ausgeprägt wäre.

Zusammenfassend sollte erwähnt werden, dass die meisten dieser Änderungen hier erstmals beobachtet wurden. Die genauen molekularen Ursachen und Auswirkungen, sowie die Positionen der betroffenen Modifikationen sind daher noch ungeklärt. Speziell der starke Anstieg von Gm in tRNA<sup>Tyr</sup> bei Queuin-Mangel erscheint, basierend auf den bisherigen Daten, als vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen und sollte eingehender erforscht werden.

### 3.4.3 Vergleichende NAIL-MS Untersuchungen der Queuin-Fütterung

Zur näheren Untersuchung der Auswirkungen von Queuin-Supplementierung sollten NAIL-MS-Experimente durchgeführt werden. Änderungen im Modifikationsprofil der einzelnen tRNA-Isoakzeptoren können somit bestimmt werden. Außerdem kann aus den Daten der gleichen Messung die tRNA-Isoakzeptor-Abundanz berechnet werden. Zellen wurden in unmarkiertem Medium ohne zusätzliche Supplementierung von Queuin kultiviert und parallel in isoto-  
 penmarkiertem Medium mit zusätzlicher Supplementierung von 50 nM Queuin kultiviert. Während der Zellernte wurden beide Kulturen vereinigt und gemeinsam prozessiert. Für die Bestimmung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz muss sowohl der jeweilige tRNA-Isoakzeptor als auch eine Referenz-RNA zur Normalisierung aufgereinigt werden. Hierfür wurde 5S rRNA gewählt welche, wie die tRNA-Isoakzeptoren auch, nach vorheriger SEC Anreicherung über Oligonukleotid-Hybridisierung aufgereinigt wurde. Nach **Gleichung 4** kann nun die Abundanz der tRNA-Isoakzeptoren über Nukleosid-MS bestimmt werden. Die Menge an detektiertem tRNA-Isoakzeptor in Queuin-mangelndem Medium (hier: unmarkiert) wird durch die entsprechende Menge an 5S rRNA normalisiert (ebenfalls unmarkiert). In denselben Proben wird die gleiche Berechnung für den tRNA-Isoakzeptor in Queuin-supplementiertem Medium (hier: isoto-  
 penmarkiert) durchgeführt. Anschließend können die beiden Werte verglichen und somit die Änderungen der tRNA-Isoakzeptor Abundanz ermittelt werden. Die hier beschriebene Vorgehensweise bezieht sich auf das „vorwärts“-Experiment (forward/fwd), wurde allerdings ebenfalls als „rückwärts“-Experiment (reverse/rvs) durchgeführt. Für das rvs-Experiment wurden Zellen ohne zusätzliche Queuin Supplementierung demnach isoto-  
 penmarkiert und umgekehrt. Eine Veranschaulichung des experimentellen Designs kann **Abbildung 3.14 A** entnommen werden. Beide Varianten wurden als Duplikat durchgeführt.

$$(4) \quad Abundanz (\%) = \frac{Isoakzeptor_{Queuin-} (pmol)}{5S rRNA_{Queuin-} (pmol)} / \frac{Isoakzeptor_{Queuin+} (pmol)}{5S rRNA_{Queuin+} (pmol)}$$

Die Werte der tRNA-Isoakzeptoren wurden durch den zuvor bestimmten Effekt der Isotopenmarkierung korrigiert (**Kapitel 3.1.3 Einfluss von NAIL-MS auf tRNA-Isoakzeptoren (NAIL-MS), Tabelle 3.2** für 5S rRNA). Vor der Anpassung wiesen die Daten des fwd- und rvs-Experiments entgegengesetzte Ergebnisse auf. Da sich zusammen betrachtet die Unterschiede aufgrund des Effektes der Isotopenmarkierung zwischen fwd- und rvs-Experiment jedoch nivellieren sollten, und sich beide Experimente nur in ihrer Isotopenmarkierung unterscheiden, erscheint es sinnvoll diese Korrektur vorzunehmen.

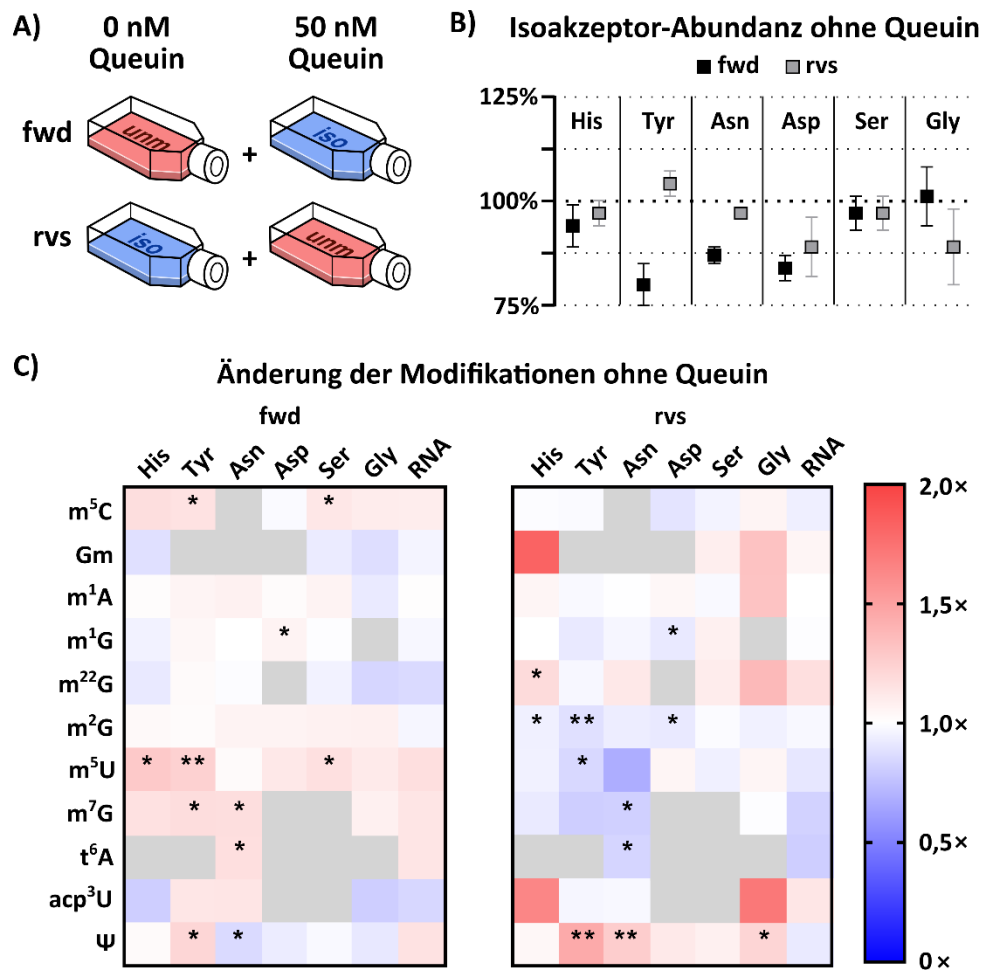
Allgemein ist, wie schon durch Northern-Blot-Analytik festgestellt, bei Mangel von Queuin im Medium eine Reduzierung der Q-abhängigen tRNA-Isoakzeptoren zu beobachten (**Abbildung 3.14 B**). Diese fällt mit Werten zwischen maximal 80–94 % allerdings merklich geringer aus als zuvor. Des Weiteren fällt auf, dass trotz der Berücksichtigung des Fehlers, der durch die Zufütterung der Isotopologe von Adenin und Uridin entsteht, noch ein erheblicher Unterschied zwischen den fwd- und rvs-Ergebnissen vorzufinden ist. Dieser war zwar vor der Korrektur weitaus stärker ausgeprägt, weist aber dennoch darauf hin, dass noch immer ein Fehler durch die Isotopenmarkierung eingeschleust werden könnte.

Wie erwartet, wird für tRNA<sup>Ser</sup> weder im fwd- noch im rvs-Experiment eine Änderung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz beobachtet. tRNA<sup>Gly</sup> weist im rvs-Experiment zwar eine deutliche Verringerung der Abundanz um ~ 10 % auf, dieser Effekt bestätigt sich im fwd-Experiment allerdings nicht. Die Fehler innerhalb der einzelnen Werte sind hier zudem vergleichsweise hoch, wodurch eine genauere Interpretation erschwert wird. Die Isoakzeptoren tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup> und tRNA<sup>Asp</sup> weisen sowohl im fwd- als auch im rvs-Experiment eine Reduzierung beim Mangel von Queuin auf. Dennoch unterscheidet sich der Effekt aufgrund der Isotopenmarkierung zwischen dem fwd- und rvs-Experiment. Es ist davon auszugehen, dass sich die tatsächliche Veränderung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz zwischen beiden Werten befindet. Für tRNA<sup>Tyr</sup> sind diese Unterschiede so stark ausgeprägt, dass das fwd- und rvs-Experiment entgegengesetzte Ergebnisse aufweisen. Daher scheint diese Methode, insbesondere für tRNA<sup>Tyr</sup> eher weniger geeignet zu sein. Obwohl die Interpretation des hier gezeigten Datensatzes erschwert ist, konnte der Trend, welcher bereits durch Northern-Blot-Analytik festgestellt wurde, bestätigt werden. Für eine konkretere Aussage sollte sowohl die Bestimmung des Effekts, der durch die Zufütterung der Isotopologe von Adenin und Uridin entsteht, als auch das Experiment zur Auswirkung von Q-Mangel erneut durchgeführt werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass für beide Experimente ausreichend Replikate vorhanden sind, um verlässliche Ergebnisse erhalten.

Anhand desselben Datensatzes sollten die Unterschiede im Modifikationsprofil in Abhängigkeit von Queuin gezeigt werden. Zum Zwecke der besseren Überschaubarkeit wurden die Ergebnisse erneut als Heatmap dargestellt (**Abbildung 3.14 C**). Absolute Werte aller Modifikationen in den aufgereinigten tRNA-Isoakzeptoren in Anwesenheit und Abwesenheit von Queuin können **Abbildung S4** entnommen werden. Während in den einzelnen Heatmaps zwar einige statistisch signifikante Effekte zu beobachten sind, können diese jeweils nur im fwd- oder nur

### 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle

im rvs-Experiment festgestellt werden. Allgemein kann beobachtet werden, dass viele Modifikationen im fwd- und rvs-Experiment einen entgegengesetzten Trend aufweisen. Da die Durchführung beider Experimente auf entgegengesetzter Isotopenmarkierung beruht, erscheint es wahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte primär auf die Zufütterung der Isotopologe von Adenin und Uridin, statt auf den Effekt der Anwesenheit von Queuin zurückgeführt werden können.



**Abbildung 3.14: NAIL-MS Daten des Einflusses von Queuin auf tRNA-Isoakzeptoren.** (A) Design des Experiments. Fwd = „Vorwärts“-Experiment, rvs = „rückwärts“-Experiment, unm = unmarkiert, iso = isotonenmarkiert. Die gewählten Farben dienen der Veranschaulichung und sind unabhängig von der folgenden Heatmap. (B) Änderung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz bei Queuin-Mangel. Die Werte wurden gemäß **Gleichung 3** berechnet. Datenpunkte geben den Mittelwert und die Standardabweichungen aus  $n = 2$  biologischen Replikaten wieder. (C) Änderung der Modifikationsdichte bei Queuin-Mangel. Modifikationen mit einer Abundanz  $< 0,1$  pro tRNA-Isoakzeptor sind grau hinterlegt. Die Ergebnisse spiegeln den Mittelwert aus  $n = 2$  biologischen Replikaten wider. Die statistische Signifikanz wurde über einen homoskedastischen, zweiseitigen  $t$ -Test ermittelt. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

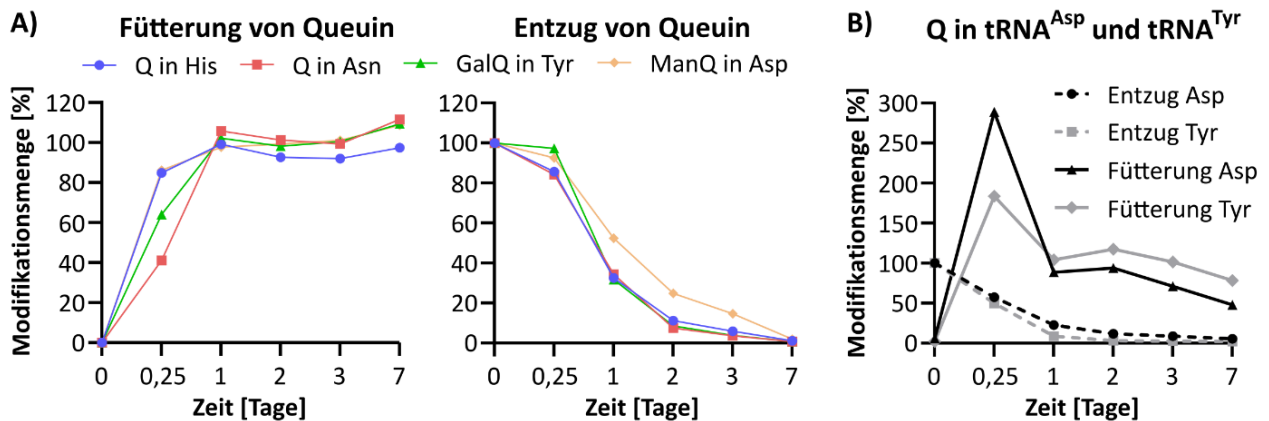
Die einzige Modifikation, die einen statistisch signifikanten, im fwd- und rvs-Experiment gleichgerichteten Effekt aufzeigt, ist  $\Psi$  in tRNA<sup>Tyr</sup>. Wie schon zuvor beobachtet (**Kapitel 3.4.2 Effekt von Queuosin auf andere Modifikationen**), kann ein Anstieg der Modifikationsmenge bei Fehlen von Queuin festgestellt werden. Die Quantifizierung von isotoopenmarkiertem  $\Psi$  wurde aufgrund eines Hintergrundsignals jedoch erschwert. Die Interpretation des Einflusses von Queuin auf die Abundanz von  $\Psi$  ist in diesem Datensatz daher kritisch zu betrachten. Zudem wurden Änderungen und statistische Signifikanzen durch lediglich 2 biologische Replikate ermittelt.

Eine Aussage über die Auswirkung des Fehlens von Queuin im Medium auf das Modifikationsprofil kann aufgrund des Effektes der Zufütterung der Isotopologe von Uridin und Adenin kaum getroffen werden und soll daher auch nicht angestrebt werden. Nichtsdestotrotz kann durch die Daten ein Erkenntnisgewinn erzielt werden: Eine Korrektur der Ergebnisse hinsichtlich des Effekts, der durch die Isotoopenmarkierung eingeschleppt wird, erscheint, wie schon zuvor für die Bestimmung der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz sinnvoll. Auf diese wurde hier allerdings bewusst verzichtet, da es sich bei der Bestimmung des Isotopeneffektes um eine einzelne Durchführung des entsprechenden Experiments handelt und die hier gezeigten Daten aus einem Duplikat berechnet wurden. Falls eine Korrektur erwünscht ist, fordert der komplexe Versuchsaufbau jedoch die Bereitstellung mehrerer Replikate, um eine verlässliche Aussage treffen zu können. Der Versuch der Bereinigung der hier gezeigten Daten lieferte daher auch keine tieferen Einblicke in die molekularen Geschehnisse bei Queuin-Mangel. In zukünftigen Experimenten sollte daher in Betracht gezogen werden, dass bei vergleichenden NAIL-MS-Experimenten zusätzlich auf den Effekt der Isotoopenmarkierung eingegangen wird. Dies wird in Reichle *et al.* (*Methods*, **2019**) ebenso verdeutlicht. Sowohl die Bestimmung des Isotopeneffektes als auch die Durchführung des eigentlichen Experiments sollten mindestens im Triplikat erfolgen. Nur so kann ein verlässliches Ergebnis geliefert werden.

### 3.4.4 Fütterung/Entzug von Queuin in unmarkierter Zellkultur

In diesem Kapitel wird auf die Dynamik der Q-Modifikationen in den entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren bei Fütterung oder Entzug von Queuin eingegangen. Zellen wurden über eine Dauer von 7 Tagen in Standard-Medium (DMEM D6546) mit dialysiertem FBS kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde unter Supplementierung von 50 nM Queuin kultiviert, während ein anderer Teil der Zellen in Abwesenheit von Queuin kultiviert wurde. Durch einen Wechsel des Mediums wurde den Zellen Queuin dann entweder entzogen oder zugefüttert und der dynamische Verlauf der Q-Modifikationen in den aufgereinigten tRNA-Isoakzeptoren verfolgt. Werte wurden folgendermaßen auf den zu erwartenden Wert referenziert: Die Menge an jeweiliger Modifikation pro tRNA-Isoakzeptor wurde durch die Menge, welche für die Queuin supplementierten Zellen bei Experimentstart ermittelt wurde, dividiert und gegen die Zeit aufgetragen.

Bei der Zufütterung von Queuin fällt auf, dass ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> aber auch Q in tRNA<sup>His</sup> am schnellsten das zu erwartende Level erreichen (**Abbildung 3.15 A**). Nach lediglich 6 h erreichen beide Modifikationen bereits über 80 % der zu erwartenden Modifikationsmenge. Für Q in tRNA<sup>Asn</sup> kann nach 6 h erst ein Level von 40 % Modifizierung beobachtet werden. Beim Entzug von Queuin fällt erneut ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> auf. Im Vergleich zu den anderen Q-Modifikationen sinkt das Level von ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> deutlich langsamer ab. Nach 1 Tag verbleibt ~ 55 % der anfänglichen Modifikationsmenge. Die anderen tRNA-Isoakzeptoren weisen zu



**Abbildung 3.15: Zufütterung und Entzug von Queuin.** Zellen wurden in Standard-Medium und dialysiertem FBS mit oder ohne die zusätzliche Supplementierung von Queuin kultiviert. Nach 7 Tagen wurde die Medien getauscht und der Effekt der Fütterung bzw. des Entzugs von Queuin über mehrere Tage hinweg beobachtet. Absolute Werte wurden auf die Menge der Queuin-supplementierten Zellen bei Experimentstart referenziert. **(A)** Zeitlicher Verlauf von Q, GalQ und ManQ in den entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren. **(B)** Zeitlicher Verlauf von Q in tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Tyr</sup>.



diesem Zeitpunkt eine Modifizierung von < 40 % auf. Dieser Effekt ist auch nach einigen Tagen noch zu beobachten. Nach 3 Tagen können die Q-Modifikationen in tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup> und tRNA<sup>Asn</sup> kaum noch nachgewiesen werden; ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> weist noch ~ 20 % der ursprünglichen Modifikationsmenge auf. Erst nach Kultivierung über 7 Tage ist auch für ManQ nahezu kein Signal mehr zu detektieren.

Sowohl die Zufütterung als auch der Entzug von Queuin sprechen für eine Priorisierung von ManQ in tRNA<sup>Asp</sup>. Dieser Effekt kann durch zwei unterschiedliche molekulare Ursachen entstehen. Entweder ist die Modifizierung von ManQ34 in tRNA<sup>Asp</sup> schneller und wird in fertig prozessierten tRNA-Molekülen länger aufrechterhalten oder der Umsatz an tRNA<sup>Asp</sup> Molekülen ist im Vergleich zu anderen tRNA-Isoakzeptoren geringer. Im zweiten Fall entstehen weniger neue tRNA<sup>Asp</sup>-Moleküle, wodurch den entsprechenden Enzymen mehr Zeit für die Modifizierung von ManQ34 zur Verfügung steht. Arbeiten diese in der gleichen Geschwindigkeit wie die der anderen Q-Modifikationen, manifestiert sich das in einem schnelleren Anstieg von ManQ34 in tRNA<sup>Asp</sup>. Durch den geringeren Umsatz würden fertig prozessierte tRNA<sup>Asp</sup>-Moleküle zudem länger erhalten bleiben. Diese werden aufgrund des geringeren Umsatzes weniger stark von neu entstehenden tRNA-Molekülen verdünnt, wodurch ebenfalls ein geringeres Absinken der Modifikationsdichte zu beobachten wäre. Dieser Effekt könnte durch die Anwendung eines NAIL-MS Experiments näher untersucht werden, erfordert jedoch die Isotopenmarkierung von Queuosin. Diese konnte zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht vollständig etabliert wurde. Ein weiterer Grund für das langsamere Absinken der Q-Modifikation in tRNA<sup>Asp</sup> könnte eine langsamere aktive Demodifizierung sein. Dies setzt voraus, dass für die Entfernung der Q-Modifikationen in tRNA-Molekülen spezielle Enzyme vorhanden sind. Bis jetzt ist die Existenz solcher Enzyme nur für einige Modifikationen bekannt, dennoch sollte diese Möglichkeit in zukünftigen Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

Wie schon zuvor bei der Konzentrationsoptimierung von Queuin, kann in tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Tyr</sup> neben ManQ und GalQ auch Q detektiert werden (**Abbildung 3.15 B**). In den anfänglichen 6 h nach Zufütterung von Queuin ist ein bedeutender Anstieg von Q zu verzeichnen. In tRNA<sup>Tyr</sup> entspricht dies 200 % der zuvor detektierten Menge, in tRNA<sup>Asp</sup> sogar 300 %. Interessanterweise ist die absolute Menge von Q in tRNA<sup>Tyr</sup> allerdings zu allen Zeitpunkten ~ 10× höher als in tRNA<sup>Asp</sup>. Auch dies konnte schon zuvor bei der Konzentrationsoptimierung festgestellt werden. Nach der initialen Modifizierung von Q34 könnte die weitere Modifizierung durch Hexose-Transferasen in tRNA<sup>Asp</sup> schneller erfolgen als für tRNA<sup>Tyr</sup>. In tRNA<sup>Asp</sup>-Molekülen wäre daher größtenteils ManQ inkorporiert, wohingegen in tRNA<sup>Tyr</sup> noch eine erhebliche

### 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle

Menge an Q vorzufinden ist. Dies deutet auf eine Priorisierung von ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> gegenüber GalQ in tRNA<sup>Tyr</sup> hin. Eine schnellere initiale Modifizierung von Q34 als Erklärung für die weitaus höheren Mengen an Q in tRNA<sup>Tyr</sup> erscheint aus zwei Gründen unwahrscheinlich. Erstens ist nach 6 h im Vergleich zu GalQ eine bereits höhere Menge an ManQ zu detektieren. Dies setzt voraus, dass bereits zuvor ein Q an Position 34 eingebaut wurde und erfordert in tRNA<sup>Asp</sup> daher eine höhere oder zumindest gleiche Einbaurate von Q. Zweitens ist der relative Anstieg von Q in tRNA<sup>Asp</sup> doppelt so stark ausgeprägt. Auch dies spricht eher für einen schnelleren Einbau von Q in tRNA<sup>Asp</sup>. Vergleichsweise hohe Mengen an Q in tRNA<sup>Tyr</sup> können somit auf die langsamere Modifizierung zu GalQ zurückgeführt werden. Bereits nach einem Tag kann in beiden tRNA-Isoakzeptoren wiederum ein Rückgang der Q-Modifikationsmenge auf die zu erwartende Menge festgestellt werden. Die entsprechenden Hexosen wurde vermutlich auf eine Hydroxygruppe des Cyclopenten-Rings übertragen.

### 3.4.5 Modifikationsdynamik von tRNA in Abhängigkeit von Queuin

Abschließend wurde die Abhängigkeit der Dynamik des allgemeinen Modifikationsprofils der tRNA-Isoakzeptoren von Queuin über ein NAIL-MS-Experiment beurteilt. Zellen wurden in Spezial-Medium (DMEM D0422) mit dialysiertem FBS in Anwesenheit oder Abwesenheit von Queuin kultiviert. Bei Experimentstart wurde das unmarkierte Medium jeweils durch isotoopenmarkiertes ersetzt und neu entstehende tRNA-Moleküle nach festgelegten Zeitpunkten über Nukleosid-MS analysiert. Eine Veranschaulichung des experimentellen Designs kann **Abbildung 3.16 A** entnommen werden. Absolute Mengen der einzelnen Modifikationen in den ausgewählten tRNA-Isoakzeptoren decken sich größtenteils mit den zuvor bestimmten Mengen (**Kapitel 3.4.2 Effekt von Queuosin auf andere Modifikationen**). Der Fokus wird im Folgenden daher verstärkt auf die relative Dynamik der einzelnen Modifikationen gelegt. Hierfür wurden absolute Mengen der Modifikation pro neu entstehenden tRNA-Isoakzeptoren auf den zu erwartenden Wert (Menge originaler Modifikation bei Zeitpunkt  $t = 0$ ) der Queuin-supplementierten Zellen referenziert (**Abbildung 3.16 B**).

### 5-Methyluridin im Reifungsprozess von tRNA-Molekülen

Direkt fällt der starke Anstieg von  $m^5U$  in allen tRNA-Isoakzeptoren auf. Wie zuvor bestimmt (**Abbildung 3.13**), liegen die Erwartungswerte von  $m^5U$  in den einzelnen tRNA-Isoakzeptoren aus Zellen, welche in Queuin supplementiertem Medium kultiviert werden bei 0,31  $m^5U$  in  $tRNA^{His}$ , 1,27 in  $tRNA^{Tyr}$ , 0,07 in  $tRNA^{Asn}$  und 1,08 in  $tRNA^{Asp}$ . Absolute Mengen nach der Kultivierung über 24 h in isotoopenmarkiertem Medium sind nahezu deckungsgleich (**Tabelle 3.3**). Obwohl teilweise von zweifelslos sehr geringer Abundanz gesprochen werden kann, scheinen diese Level dennoch konstant nachweisbar zu sein.  $m^5U$  wurde in fast allen tRNA-

**Tabelle 3.3:** Absolute Mengen an  $m^5U$  in den tRNA-Isoakzeptoren über Zeit. tRNA-Isoakzeptoren wurden auf die jeweilige Sequenz normalisiert. Gesamt-tRNA wurde auf 60 kanonische Nukleoside referenziert.

$m^5U$	His	Tyr	Asn	Asp	Gesamt tRNA
0h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2h	0,53	2,14	0,90	1,35	0,96
4h	0,52	1,86	0,54	1,17	0,80
6h	0,47	1,72	0,37	1,11	0,75
24h	0,31	1,38	0,12	1,02	0,55

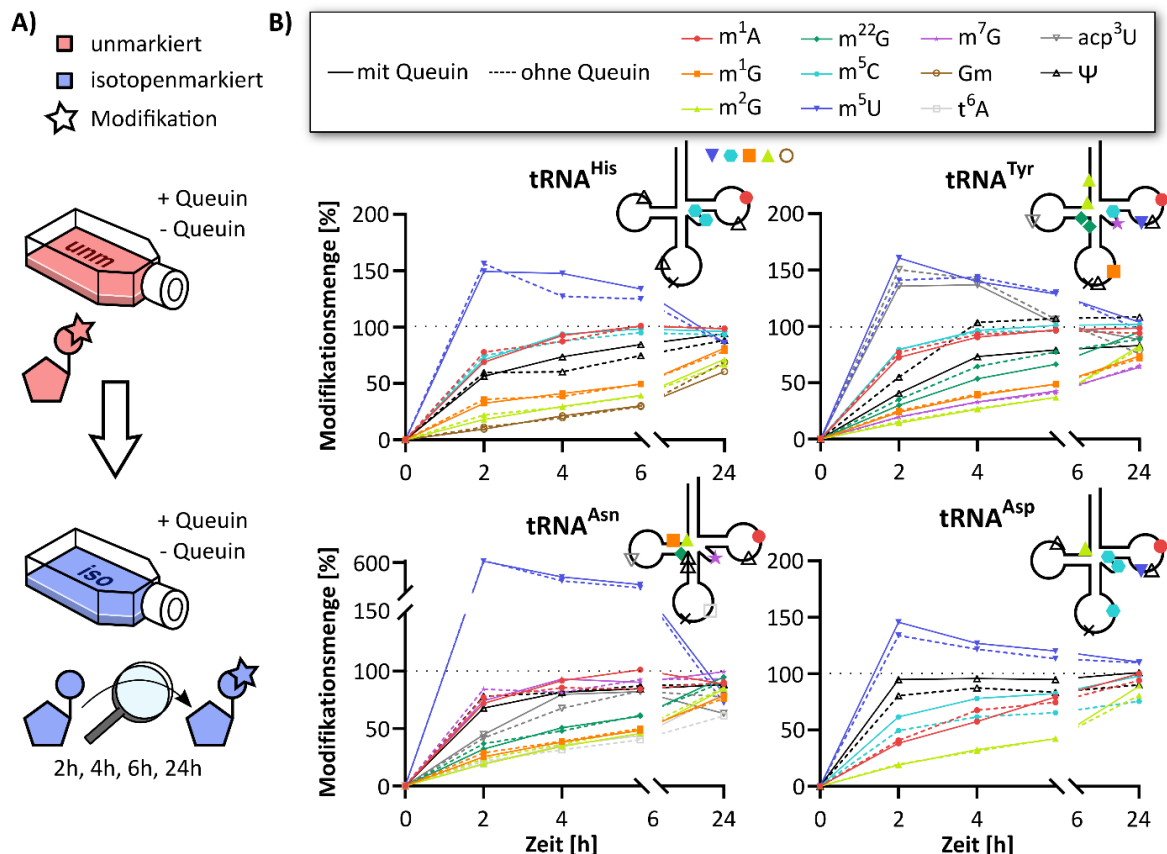
Isoakzeptoren nachgewiesen<sup>288</sup>

und bildet eine reverse Hoogsten-Basenpaarung mit dem ebenfalls fast ubiquitären  $m^1A58$  aus<sup>289</sup>. Interessanterweise

konnte  $m^5U$  in  $tRNA^{His}$  und  $tRNA^{Asn}$  bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.<sup>10</sup> Durch NAIL-MS wurde in diesen tRNA-Isoakzeptoren dennoch

$m^5U$  detektiert, welches in früheren Studien vermutlich aufgrund der geringen Abundanz übersehen wurde. Eine Besonderheit, die bei der Betrachtung des Verlaufs der Menge an  $m^5U$  auffällt, ist das sehr hohe Level nach 2 h, welches anschließend schnell wieder absinkt. Dieser Effekt ist besonders stark ausgeprägt für  $tRNA^{Asn}$ . Hier kann standardmäßig nur  $\sim 0,1 m^5U$  pro  $tRNA$ -Molekül nachgewiesen werden. Wie **Tabelle 3.3** zu entnehmen, befindet sich die Menge nach 2 h allerdings im Bereich von  $0,9 m^5U$  pro  $tRNA$ -Molekül. Dies erklärt den starken Anstieg, wie er in **Abbildung 3.16 B** zu verzeichnen ist.

Für die anderen  $tRNA$ -Isoakzeptoren werden allgemein höhere Level an  $m^5U$  vorgefunden, weshalb der Effekt dort weniger ausgeprägt wirkt. Wird jedoch die Differenz der  $m^5U$ -Menge nach 2 h gegenüber der zu erwartenden Menge berechnet, fällt auf, dass der Anstieg für andere  $tRNA$ -Isoakzeptoren ebenfalls vorhanden ist. Dieser beträgt jeweils  $0,21$  pro  $tRNA^{His}$ ,  $0,76$  pro



**Abbildung 3.16: Auswirkung von Queuin auf tRNA-Isoakzeptor Reifung.** (A) Design des Experiments. (B) Modifikationsdynamik in neu entstehenden tRNA-Isoakzeptoren. Durchgezogene Linien geben das Level in Zellen unter QBBase Supplementierung an, während gestrichelte Linien das Level in Zellen ohne QBBase angeben. Jede Farbe & Symbol repräsentiert eine Modifikation. Geplottet wurden lediglich Modifikationen mit einer Abundanz  $\geq 0,1$  pro  $tRNA$ -Molekül. Das zu erwartende Modifikationsprofil mit den entsprechenden Positionen ist für jeden tRNA-Isoakzeptor skizziert. Für  $tRNA^{His}$  konnten einige detektierte Modifikationen ( $\geq 0,1$ ) keiner Position zugewiesen werden.

tRNA<sup>Tyr</sup>, 0,78 pro tRNA<sup>Asn</sup> und 0,33 pro tRNA<sup>Asp</sup>. In tRNA<sup>Asn</sup> und in tRNA<sup>Tyr</sup> scheint dieser Effekt demnach ähnlich stark vorhanden zu sein. Zusätzlich ist der Effekt des starken Anstiegs und der darauffolgenden Reduzierung an m<sup>5</sup>U auch in Gesamt-tRNA zu beobachten (**Tabelle 3.3** und **Abbildung S5**).

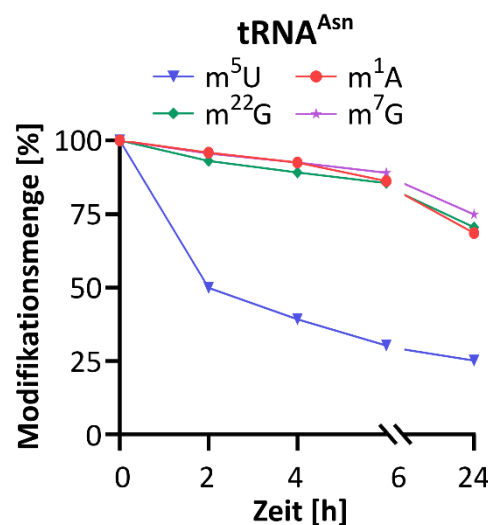
In der Sequenz von tRNA<sup>Tyr</sup> konnte bereits eine m<sup>5</sup>U-Modifikation an Position 54 nachgewiesen werden.<sup>10</sup> Angesichts der aus dem NAIL-MS Experiment erhobenen Daten scheint in tRNA<sup>Tyr</sup> eine weitere Position, die zu m<sup>5</sup>U modifiziert wird, vorhanden zu sein. Welche der beiden Positionen verantwortlich für den festgestellten Effekt ist, kann allerdings nur gemutmaßt werden. Da m<sup>5</sup>U54 eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von tRNA-Molekülen einnimmt, und dort daher hoch konserviert auftritt und zuverlässig nachgewiesen werden kann, erscheint es plausibler, dass sich die m<sup>5</sup>U-Modifikation, welche für den hier beobachteten Effekt verantwortlich ist, an anderer Stelle befindet. Oligonukleotid-MS, könnte hier zur Aufklärung der Fragestellung beitragen, und sollte für zukünftige Experimente in Betracht gezogen werden.

Falls als Teil des Reifungsprozesses von tRNA-Molekülen tatsächlich eine Entfernung von m<sup>5</sup>U stattfindet, wäre eine noch frühere Inkorporation von m<sup>5</sup>U in entstehende tRNA-Moleküle notwendig. Dies kann entweder durch die direkte Inkorporation von m<sup>5</sup>UTP in das naszierende Oligonukleotid oder durch die nachträgliche Methylierung eines Uridins geschehen. Ersteres setzt voraus, dass das entsprechende Triphosphat von der Zelle gebildet wird und könnte ebenso einen zufälligen fehlerhaften Einbau von m<sup>5</sup>U in tRNA-Moleküle darstellen. Während dies nicht ausgeschlossen werden kann, sind im Nukleotid-Stoffwechsel keine Enzyme beschrieben, welche eine entsprechende Reaktion katalysieren. Eine Methylierung der C5-Position durch das Enzym Thymidylat-Synthetase findet in Uridin ausschließlich statt, falls dieses in Form von dUMP vorliegt. Für das daraus entstehende dTMP existiert wiederum kein beschriebener Reaktionspfad, um dieses in m<sup>5</sup>UTP umzuwandeln. Darüber hinaus wird für die Methylierung von dUMP zu dTMP der Cofaktor 5-Methyl-Tetrahydrofolat verwendet, welcher zwar für die Methylierung von Homocystein zu Methionin verwendet wird, umgekehrt aber nicht von Methionin remethyliert werden kann. Die im vorliegenden Experiment gezeigten Ergebnisse kommen jedoch durch die Inkorporation einer D<sub>3</sub>-Methylgruppe in die m<sup>5</sup>U-Modifikation zustande. Da dies durch Zufütterung von D<sub>3</sub>-Methionin erreicht wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das entstehende m<sup>5</sup>U nicht über den (zwangsweise unmarkierten) Cofaktor Folat methyl-

iert wurde, und daher auch nicht in Form von  $m^5UTP$  in naszierende Oligonukleotide inkorporiert wurde. Eine enzymatische, cotranskriptionale Methylierung eines Uridins erscheint daher schlüssiger als der direkte Einbau von  $m^5U$ .

Als Teil des Reifungsprozesses der tRNA-Moleküle wäre eine anschließende Entfernung von  $m^5U$  entweder durch einen bisher nicht beschriebenen Eraser oder durch Spleißen des Sequenzbereiches, in dem sich  $m^5U$  befindet, erforderlich. Ein ähnlicher Mechanismus wurde kürzlich in mRNA entdeckt. Dort werden Introns mit der Modifikation  $m^1\Psi$  versehen, welche anschließend im Reifungsprozess der mRNA herausgeschnitten werden.<sup>290</sup> Basierend auf der Anreicherung von tRNA über Größenausschlusschromatographie (SEC) kann allerdings davon ausgegangen werden, dass  $m^5U$  erst nach vollendetem Spleißen der prä-tRNA entfernt wird. Aufgereinigt wurden lediglich Moleküle der Länge 60 – 90 Nukleotide. Jegliche größere Moleküle, wie in vielen Fällen beispielsweise prä-tRNA (~ 90–150 Nukleotide)<sup>291</sup> werden daher in der Analytik nicht beachtet. Ein erhöhtes Level an  $m^5U$  müsste demnach selbst in fertig gespleißten tRNA-Molekülen vorhanden sein.

Nach Erreichen des jeweils zu erwartenden Levels, fällt die Menge an  $m^5U$  in  $tRNA^{Asn}$  weiterhin ab. Dies konnte festgestellt werden, da nach dem Wechsel zu isotope markiertem Medium bereits existierende tRNA-Moleküle aufgrund des entstehenden Masseunterschieds von neu entstehenden unterschieden werden können. Das Absinken der Menge an  $m^5U$  in den originalen  $tRNA^{Asn}$ -Molekülen ist im Vergleich zu anderen Modifikationen überproportional stark ausgeprägt (**Abbildung 3.17**). Dies spricht gegen den Abbau von tRNA-Molekülen als Ursache für die Reduktion von  $m^5U$ . Die Hypothese einer aktiven Demodifizierung von  $m^5U$  als Teil des Reifungsprozesses von tRNA-Molekülen wird daher gestärkt.



**Abbildung 3.17: Auswirkung von Queuin auf originale  $tRNA^{Asn}$ .** Absolute Mengen an originaler Modifikation pro  $tRNA^{Asn}$  wurden auf die jeweilige Menge bei Zeitpunkt  $t = 0$  unter Queuin Supplementierung referenziert.

Alle Signale der Nukleosid-MS Analytik waren zudem ohne Probleme integrierbar und befanden sich weit über dem unteren Quantifizierungslimit (LLOQ) im linearen Bereich der Kalibriergeraden. Da in originalen tRNA-Molekülen ein ähnlicher Effekt zu beobachten ist, die Level zu Experimentbeginn dort jedoch merklich höher sind, sollte ein Fehler aufgrund falscher



Quantifizierung ausgeschlossen werden können. Außerdem wurde geprüft, ob isotonenmarkiertes Uridin, welches für die Markierung der Nukleoside verwendet wurde, durch  $m^5U$  verunreinigt ist. Eine solche Verunreinigung würde dazu führen, dass  $m^5U$  an die Zellen verfüttert wird, und könnte durch Inkorporation ebendieses in RNA-Moleküle somit ein erhöhtes Level an  $m^5U$  erklären. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Uridin-Stocklösung konnte allerdings kein Signal für  $m^5U$  detektiert werden.

Die vorgefundenen Daten deuten auf die cotranskriptionale Methylierung eines Uridins zu  $m^5U$  hin, welches anschließend, im Zuge des Reifungsprozesses von tRNA-Molekülen von einem Eraser entfernt wird. Für  $acp^3U$  in  $tRNA^{Tyr}$  konnte im Übrigen ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden. Hier steigt das Level ebenfalls erst drastisch auf ~ 150 % an, bevor die Menge erneut auf den Erwartungswert abfällt. Allerdings konnte  $acp^3U$  nicht problemlos quantifiziert werden, weshalb die Ergebnisse hier kritischer betrachtet werden müssen. Während deshalb nicht näher auf den Effekt von  $acp^3U$  eingegangen wird, sollte auf dessen Dynamik in Zukunft ebenfalls geachtet werden.

### Dynamik weiterer Modifikationen in Abhängigkeit von Queuin

Zuletzt soll näher auf die von Queuin abhängigen Unterschiede weiterer Modifikationen im Reifungsprozess von tRNA-Molekülen eingegangen werden. Die größten Abweichungen sind meist 6 h nach Mediumwechsel zu beobachten, weshalb **Tabelle 3.4** eine bessere Übersicht der Modifikationsmengen zu diesem Zeitpunkt darstellt. Gelistet sind lediglich Modifikationen, welche in mindestens einem der tRNA-Isoakzeptoren eine Abweichung im Reifungsprozess abhängig von Queuin-Supplementierung aufwiesen.

Eine auffallende Abweichung tritt bei der Inkorporation von  $m^5C$  in  $tRNA^{Asp}$  auf. So ist die Menge an  $m^5C$  in  $tRNA^{Asp}$  nach 6 h um 21 % erhöht, wenn Zellen in Anwesenheit von Queuin kultiviert wurden (**Abbildung 3.16** und **Tabelle 3.4**). Ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von ManQ, bedingt durch die Zufütterung von Queuin, und der Abundanz von  $m^5C$  in  $tRNA^{Asp}$  konnte bereits zuvor über Bisulfit-Sequenzierung nachgewiesen werden.<sup>23</sup> Eine Zufütterung von Queuin konnte dabei mit erhöhter Modifikationsmenge von  $m^5C38$  in  $tRNA^{Asp}$  in Verbindung gebracht werden. Die molekulare Ursache hinter der erhöhten Menge von  $m^5C38$  in  $tRNA^{Asp}$  in Anwesenheit von ManQ konnte zwar nicht vollständig geklärt werden, prinzipiell sind hierfür jedoch zwei Mechanismen denkbar: Sowohl eine erhöhte Methylierungsrate von C38, als auch ein verringerter Abbau von  $m^5C38$ -modifizierter  $tRNA^{Asp}$  könnte dieses Phänomen erklären. Bekannt ist außerdem, dass  $m^5C38$  im Gegensatz zu den häufig

**Tabelle 3.4 Unterschiede im Reifungsprozess von tRNA-Molekülen in Abhängigkeit von Queuin.** Zellen wurden ohne (-) oder mit (+) 50 nM Queuin in Spezial-Medium mit dialysiertem FBS kultiviert. Die Werte geben die Anzahl an Modifikation pro tRNA-Isoakzeptor-Molekül bzw. pro 1000 Nukleosiden im Falle von Gesamt-tRNA an. Die hier aufgeführten Werte entsprechen dabei der Modifikationsdichte in neu entstehenden tRNA-Molekülen nach 6 Stunden Kultivierung in isotoopenmarkiertem Medium. Der Faktor gibt die Änderung der Modifikationsmenge bei Fehlen von Queuin im Medium an.

tRNA	Queuin	Ψ	m <sup>1</sup> A	m <sup>5</sup> U	m <sup>5</sup> C	m <sup>22</sup> G
His	-	2,74	0,72	0,44	3,02	
	+	3,10	0,72	0,47	3,13	
	Faktor (%)	<b>88</b>	<b>100</b>	<b>93</b>	<b>97</b>	
Tyr	-	2,77	0,73	1,73	1,26	1,92
	+	2,04	0,73	1,72	1,32	1,64
	Faktor (%)	<b>135</b>	<b>99</b>	<b>101</b>	<b>95</b>	<b>117</b>
Asn	-	3,00	0,64	0,30		0,67
	+	2,98	0,77	0,37		0,66
	Faktor (%)	<b>101</b>	<b>83</b>	<b>81</b>		<b>101</b>
Asp	-	1,23	0,46	1,05	2,37	
	+	1,40	0,49	1,11	2,99	
	Faktor (%)	<b>88</b>	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>79</b>	
Gesamt-tRNA	-	48,9	10,9	10,9	30,6	6,7
	+	59,8	11,0	12,4	35,4	6,4
	Faktor (%)	<b>82</b>	<b>99</b>	<b>87</b>	<b>86</b>	<b>105</b>

vertretenen Modifikationen m<sup>5</sup>C48 und m<sup>5</sup>C49 vom Enzym DNMT2 statt von NSUN2 inkorporiert wird.<sup>292</sup> Eine tRNA-assoziierte Kristallstruktur von DNMT2 zur Aufklärung des Mechanismus konnte bisher nicht analysiert werden. Durch gezielte Mutationen einzelner Aminosäuren des Enzymes konnten jedoch Vermutungen über die Bindungsstellen am tRNA-Molekül aufgestellt werden.<sup>169</sup> So besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass DNMT2 das tRNA-Molekül unter anderem über die Anticodon-Schleife erkennt. ManQ könnte bei der Substraterkennung eine essenzielle Rolle einnehmen. In einer Hypothese initiiert ManQ eine leichte Änderung der Geometrie des Anticodon-Loops, um DNMT2 einen besseren Zugang zu C38 zu verschaffen.<sup>169</sup> Die entstehende Bindung führt dabei zu einem energetisch ungünstigen Übergangszustand. Dieser könnte ebenfalls durch eine Konformationsänderung, welche durch die Anwesenheit von ManQ beeinflusst wird, stabilisiert werden und somit die katalytische Aktivität von DNMT2 erhöhen.<sup>168, 170</sup> In allen Szenarien wäre die Inkorporation von m<sup>5</sup>C38 durch die Anwesenheit von ManQ begünstigt.

Während zuvor über die mechanistischen Ursachen des Anstiegs von  $m^5C38$  nur Vermutungen angestellt werden konnten, kann durch die erhobenen Daten aus dem vorliegenden NAIL-MS Experiment mehr Einsicht gewonnen werden. Diese belegen eine Entstehung des Unterschieds in der Modifikationsmenge schon früh im Lebenszyklus des tRNA-Moleküls. Bereits nach 2 Stunden kann eine Differenz zwischen beiden Kulturen festgestellt werden, welche nach 6 Stunden noch deutlicher ausgeprägt ist (**Abbildung 3.16** und **Tabelle 3.4**). Diese kann lediglich über eine erhöhte Einbaurate von  $m^5C$ -Modifikationen abhängig von Queuin erklärt werden. Da sich der Unterschied zwischen beiden Kulturen bereits nach 2 h einstellt und bis zum Ende des Experiments bestehen bleibt, kann die Differenz auf die Modifikationsmenge von  $m^5C38$  zurückgeführt werden. Eine durch die ManQ-Modifikation verbesserte Erkennung des Substrats durch DNMT2, wie sie zuvor erläutert wurde wirkt schlüssig. Da der Effekt bereits nach 2 h das volle Ausmaß erreicht, erscheint es wahrscheinlich, dass ManQ zu diesem Zeitpunkt ebenfalls voll modifiziert ist. Die zuvor argumentierte hohe Priorisierung von ManQ in  $tRNA^{Asp}$  gegenüber den anderen Q-Modifikationen in den entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren spricht für diesen Verdacht. Interessanterweise konnte jedoch festgestellt werden, dass bereits 10 nM Queuin für die volle  $m^5C38$ -Modifizierung ausreichend sind (**Abbildung S6**). Bei dieser Konzentration konnte jedoch nur 77 % der zu erwartenden Modifikationsmenge für ManQ beobachtet werden. Für GalQ waren es 66 %, während Q jeweils nur knapp über 40 % aufwies.

Eine Änderung der  $m^{22}G$ -Menge in  $tRNA^{Tyr}$  fiel im Zuge dieser Arbeit in unmarkierter Zellkultur ebenfalls schon zuvor auf (**Abbildung 3.13**). Bei Fehlen von Queuin im Medium konnte eine minimale, aber statistisch signifikante Reduzierung von  $m^{22}G$  festgestellt werden. In vorangegangenen, hier nicht gezeigten Experimenten konnte bei Abwesenheit von Queuin in einigen Fällen jedoch auch ein Anstieg von  $m^{22}G$  beobachtet werden. Diese zuerst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse können nun durch den Reifungsprozess von  $tRNA^{Tyr}$  erklärt werden: In Abwesenheit von Queuin scheint die Inkorporation von  $m^{22}G$  in  $tRNA^{Tyr}$  effizienter und damit schneller abzulaufen (**Abbildung 3.16** und **Tabelle 3.4**). Zum Endzeitpunkt nach 24 h ist in beiden Kulturen jedoch eine nahezu identische Menge an  $m^{22}G$  vorhanden. Je nach Zeitpunkt der Zellernte können abhängig von der Queuin-Supplementierung somit unterschiedliche Mengen an  $m^{22}G$  detektiert werden. Eine potenzielle Erklärung für dieses Phänomen könnte die Auswirkung einer sterischen Hinderung durch GalQ sein. Dieses wird im Anticodon an Position 34 eingebaut, weist vergleichsweise große funktionelle Gruppen auf und befindet sich nach Faltung der tRNA in räumlicher Nähe zu Position 26 an welcher  $m^{22}G$  üblicherweise inkorporiert wird.<sup>55</sup> Das für den Einbau verantwortliche Enzym TRMT1,<sup>293, 294</sup> könnte somit

ausgehend von einer sterischen Hinderung durch GalQ34 verminderten Zugang zur Position 26 haben, wodurch die  $m^{22}\text{G}$ -Modifikation letztendlich langsamer eingebaut wird. Zusätzlich konnte in aktuellen Untersuchungen TRMT1-defizienter Zellen ein Anstieg von GalQ in  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  beobachtet werden (unpublizierte Daten, Gregor Ammann, AK Kellner). Der genaue Zusammenhang dieser beiden Modifikationen kann zwar aufgrund der aktuellen Datenlage noch nicht geklärt werden, eine Abhängigkeit scheint aber zweifelslos zu bestehen.

Des Weiteren kann in fast allen tRNA-Isoakzeptoren ein Unterschied im Einbau von  $\Psi$  festgestellt werden (**Abbildung 3.16** und **Tabelle 3.4**). Es sollte allerdings erwähnt werden, dass die meisten  $\Psi$ -Signale aus neu entstehenden tRNA-Molekülen von einem Hintergrundsignal überlagert werden, welches lediglich beim Massenübergang von isotoopenmarkiertem  $\Psi$  auftritt. Eine zuverlässige Quantifizierung ist daher kaum möglich. Besonders davon beeinträchtigt sind die Werte nach 2 h und 4 h, zum Teil aber auch noch nach 6 h. Erst nach 24 h kann wieder von einer größtenteils korrekten Quantifizierung ausgegangen werden. Sowohl in  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Asp}}$ , als auch in Gesamt-tRNA wird ein geringeres Level an  $\Psi$  detektiert wenn Zellen in Abwesenheit von Queuin kultiviert werden. Dies deckt sich nur teilweise mit zuvor ermittelten Daten und erschwert daher eine Interpretation. In  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  dagegen ist im „Pulse-Chase“-Experiment nach 24 h ein deutlicher Anstieg an  $\Psi$  zu erkennen. Beim Mangel von Queuin wird ein deutlich höherer Wert von 135 % detektiert. Dies konnte bereits zuvor in **Kapitel 3.4.1 Auswirkungen von Queuin-Supplementierung in Zellkultur** beobachtet werden und scheint daher ein reproduzierbarer Effekt zu sein. Eine mögliche Erklärung könnte durch die berichtete Modifikation  $m^1\Psi39$  in  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  geliefert werden,<sup>10</sup> welche im vorliegenden Datensatz leider nicht analysiert wurde. Bei Abwesenheit von Queuin kann jedoch eine höher als zu erwartende Menge an  $\Psi$  detektiert werden. Laut diverser Datenbanken werden in  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  lediglich zwei  $\Psi$ -Modifikationen inkorporiert:  $\Psi35$  und  $\Psi55$ . Dies entspricht recht genau der hier beobachteten Menge von 2,04 bei Anwesenheit von Queuin. Bei der Abwesenheit von Queuin wurde allerdings eine weitaus höhere Menge von 2,77  $\Psi$ -Modifikationen vorgefunden. Ähnlich wie bereits zuvor für DNMT2 beobachtet, könnte die Pseudouridine-N1-Methyltransferase (für tRNA noch unbekanntes Enzym, Nep1 für rRNA), welche für die weitere Modifizierung von  $\Psi39$  zu  $m^1\Psi39$  verantwortlich ist, eine Abhängigkeit von GalQ zeigen. Ein Fehlen von GalQ34 würde somit zu einer höheren Menge an  $\Psi$  und einer geringeren Menge an  $m^1\Psi$  führen.  $m^1\Psi$  sollte daher in zukünftigen Experimenten in die Analyse aufgenommen werden.

Die Modifikation  $m^1\text{A}$  zeigt lediglich in  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$  einen geringfügigen Effekt (**Abbildung 3.16** und **Tabelle 3.4**). Wie schon zuvor anhand unmarkierter Zellkultur-Experimente festgestellt

(Abbildung 3.13), ist unter Queuin-Mangel eine verringerte Menge an  $m^1A$  vorzufinden. Nach 6 h im isotoopenmarkierten Medium entspricht dies einer Reduktion von 17 %. Nach 24 h wird in beiden Kulturen allerdings wieder ein identisches Level an  $m^1A$  ermittelt. Da hier nur von minimalen Effekten die Rede ist, und die Ergebnisse zuvor entweder äußerst schwach ausgeprägt oder statistisch nicht signifikant und daher nicht sehr aussagekräftig waren, wird auf eine Interpretation hier verzichtet.

Der bereits mittels Bisulfit-Sequenzierung festgestellte Einfluss von Queuin-Fütterung auf die Inkorporation von  $m^5C38$  in  $tRNA^{Asp}$  konnte im Zuge dieser Arbeit mittels LC-MS und der Anwendung von NAIL-MS bestätigt werden. Zusätzlich konnte die molekulare Ursache der erhöhten  $m^5C$ -Menge auf eine schnellere Methylierung zurückgeführt werden. Ohne die Anwendung von NAIL-MS wäre dies über keine andere massenspektrometrische Technik möglich. Da die Bestätigung einer Abhängigkeit zwischen der Anwesenheit von Queuosin und der Inkorporation von  $m^5C38$  durch DNMT2 zum Teil auch als Validierung der NAIL-MS-Methodik angesehen werden kann, wird die Stichhaltigkeit aller weiteren beobachteten Effekte erhöht.

Die Zugabe von Queuin zum Medium und die damit verbundene Inkorporation der Q-Modifikationen in die jeweiligen tRNA-Isoakzeptoren scheint weitere vielfältige Einflüsse auf andere Modifikationen zu nehmen und sollte daher eingehender untersucht werden. Alles in Allem scheint  $tRNA^{Tyr}$  für diese Unterfangen am besten geeignet zu sein. Der für  $m^5U$  beobachtete Effekt ist bei stets hoher Menge an  $m^5U$  in  $tRNA^{Tyr}$  vergleichsweise stark ausgeprägt. Dadurch kann eine verlässliche Quantifizierung schon zu frühen Zeitpunkten erfolgen. Der gleiche Effekt ist in  $tRNA^{Asn}$  prozentual zwar stärker ausgeprägt, dort gestaltet sich die Quantifizierung aufgrund der teils sehr geringen Mengen allerdings schwieriger. In allen tRNA-Isoakzeptoren wäre eine aktive Demodifizierung einzelner Positionen als Teil des Reifungsprozesses eine bisher nicht beschriebene, bahnbrechende Entdeckung. In  $tRNA^{Tyr}$  ist außerdem die Modifikation  $acp^3U$  enthalten, welche einen vergleichbaren Effekt zeigte. Weitere interessante Beobachtungen unter Abwesenheit von Queuin sind die höhere Einbaukinetik von  $m^{22}G$  und die stark erhöhten Level an Gm in  $tRNA^{Tyr}$ . Durch Studien in Mensch und Maus konnte eine Korrelation zwischen der  $m^{22}G$ -Inkorporation durch TRMT1/TRM1 und neurologischen Erkrankungen festgestellt werden.<sup>75, 295</sup> Dies verdeutlicht die Relevanz der hier gefundenen Effekte.

Für weiterführende Experimente sollte zudem eine Isotopenmarkierung von Queuosin angestrebt werden. Die Zufütterung von unmarkiertem Queuin kombiniert mit Medien, welche unmarkierte Glukose enthalten, führt aufgrund der Biosynthese in Eukaryoten stets zu unmarkier-

### 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle

tem Queuosin.<sup>296, 297</sup> Isotopenmarkiertes Queuin ist kommerziell nicht erhältlich, die Zufütterung von isotopenmarkierter Glukose erscheint für die Markierung von Q-Modifikationen allerdings vielversprechend. Erste erfolgreiche Versuche, welche nicht mehr Teil dieser Arbeit sind, konnten bereits eine Isotopenmarkierung der Ribose und der angehängten Hexose belegen und sollten somit den Weg für weitere aufschlussreiche Untersuchungen ebnen.



## 3.5 Weitere Nicht publizierte Daten

### 3.5.1 Inhibition von ALKBH3 durch Rhein

Methylgruppen an Nukleosiden, insbesondere von  $m^1A$  und  $m^3C$ , werden in der Zelle von Enzymen der Familie der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, kurz ALKB entfernt.<sup>206, 298–300</sup> Dies geschieht über Oxidation der Methylgruppe durch einen Eisen(II)- und  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Mechanismus und darauffolgende Decarboxylierung.<sup>301</sup> Schon früh war bekannt, dass diese Enzyme ungewollte Methylierungs-Schäden an DNA entfernen. Später konnte festgestellt werden, dass die Familie der ALKB-Enzyme, insbesondere ALKBH3, ebenso eine wichtige Rolle in der Reparatur von durch MMS geschädigter mRNA und tRNA einnehmen.<sup>194</sup> Durch die Korrelation solcher Schäden zu einigen neurologischen Krankheiten wird dieses Forschungsfeld besonders interessant. Viele Chemotherapeutika basieren auf alkylierenden Eigenschaften. Alkylanzien, wie Melphalan (gegen multiples Myelom) oder Chlorambucil (gegen Leukämie) werden oftmals für die Behandlung verschiedenster Krebserkrankungen verwendet.<sup>302</sup> Die Aktivität der ALKB-Enzyme erschwert dabei die Anwendung vieler dieser Therapeutika. In einigen Krebsarten konnte gezeigt werden, dass Enzyme der ALKB-Familie besonders aktiv sind, und die Methylierungs-Schäden, welche zum Absterben der Zellen führen sollen, somit wieder abgenommen werden.<sup>195, 303–305</sup> Dies führt dazu, dass die Therapeutika nicht in vollem Umfang wirken können. Eine gezielte Inhibition der ALKB-Enzyme kann hier hilfreich sein.<sup>306</sup> Ein solcher Inhibitor wäre beispielsweise  $\alpha$ -Hydroxyglutarat, welches in der Zelle bei einer Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase angereichert ist. Durch  $\alpha$ -Hydroxyglutarat werden ALKBH-Enzyme kompetitiv inhibiert, indem die Bindungsstelle von  $\alpha$ -Ketoglutarat blockiert wird. Patienten, welche eine Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase tragen sind daher gegenüber Alkylanzien sensibilisiert, was zu einem nachgewiesenen Anstieg des Erfolgs von bestimmten Chemotherapien führt.<sup>307</sup> Rhein, einem Naturprodukt aus der Gruppe der Anthranoide, wurde ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf FTO (Fat mass and obesity-associated protein, ALKB-Familie) und ALKBH3 zugesprochen.<sup>308, 309</sup> Während in der Literatur die Wirkung von Rhein als Inhibitor von ALKBH-Enzymen nur indirekt nachgewiesen werden konnte, kann NAIL-MS Aufschluss darüber geben, ob Rhein tatsächlich als Inhibitor der ALKBH-Enzyme wirkt. Aus diesem Grund sollte der Effekt von Rhein auf das Modifikationsprofil von RNA anhand von NAIL-MS untersucht werden.

Der in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöste Rhein-Stock wurde im Zellkulturmedium je nach Experiment 500-fach oder stärker verdünnt. Die daraus resultierende DMSO-Konzentration im

### 3.5 Weitere Nicht publizierte Daten

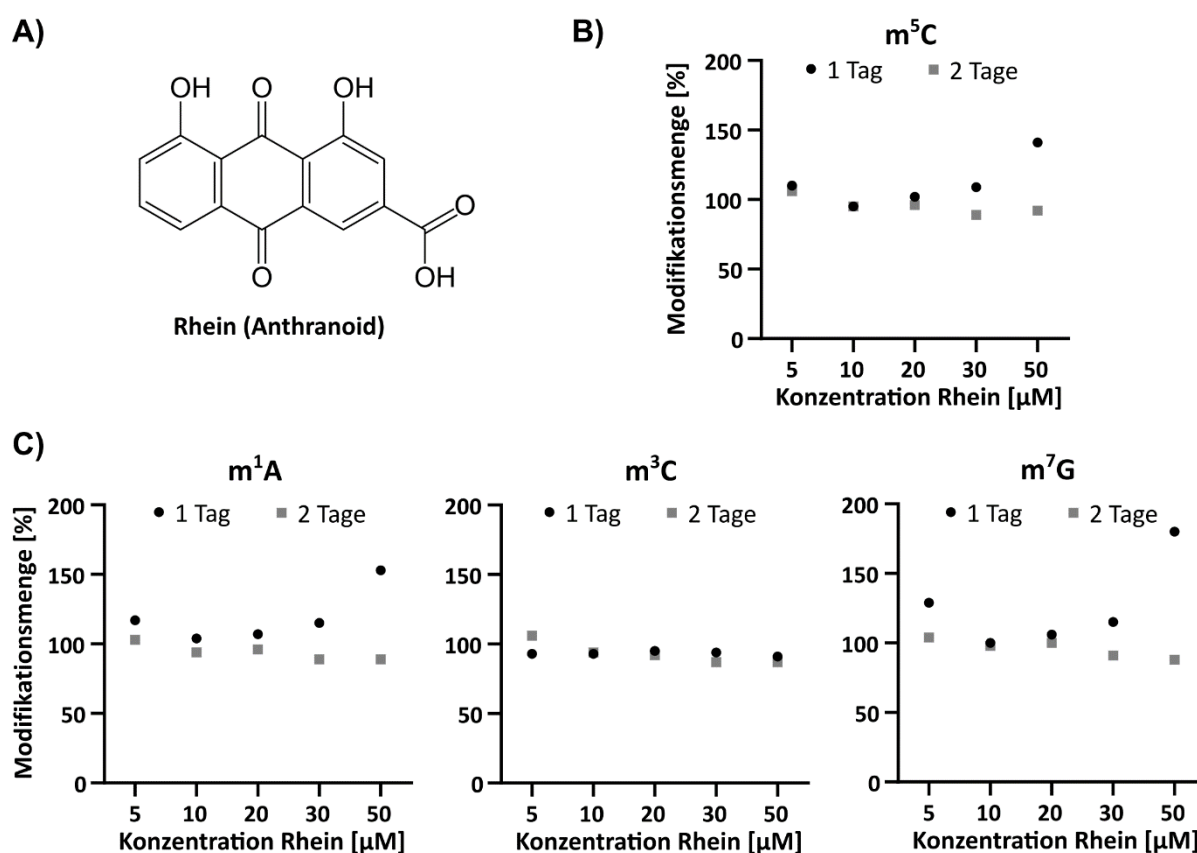
Medium beträgt stets unter 0,2 % und sollte daher für die Zellen unschädlich sein. Kontrollstudien wurden dennoch mit der entsprechenden Menge an reinem DMSO (Mock) durchgeführt.

In einer ersten Studie wurde die ideale Konzentration an Rhein (**Abbildung 3.18 A**) ermittelt. Zellen wurden in aufsteigenden Konzentrationen zwischen 0  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  für einen oder zwei Tage, beginnend 24 h nach dem Aussäen, kultiviert. Während Zellen bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Rhein einen kaum veränderten Phänotyp aufwiesen, wurden bei Zellen, welche in 20  $\mu\text{M}$  Rhein kultiviert wurden, erste Anzeichen von Zellstress sichtbar: Die Zellen wurden runder und die Teilungsrate verringerte sich leicht. Bei 50  $\mu\text{M}$  Rhein fand kaum noch Zellteilung statt, die Zellen scheinen sich in einem Zellzyklus-Arrest zu befinden.<sup>310</sup>

Anschließend wurde tRNA über SEC angereichert und nach Verdau zu Nukleosiden über Nukleosid-MS quantifiziert. Modifikationsmengen wurden pro tRNA-Molekül berechnet und über die Kontrolle (0  $\mu\text{M}$ ) normalisiert. Für die Modifikation  $\text{m}^5\text{C}$  ist für jede Konzentration ein Werte von  $\sim 100\%$  zu erwarten, da  $\text{m}^5\text{C}$  kein bekanntes Substrat von ALKBH3 ist. Für die Kultivierung über 2 Tage trifft dies größtenteils zu (**Abbildung 3.18 B**). Alle Werte befinden sich im Bereich 89–106 %. Diese Ergebnisse stellen ein einzelnes Experiment, ohne Replikate dar und befinden sich im erwarteten Bereich. Bei der Kultivierung über 1 Tag fällt der Anstieg an Modifikationsmenge mit ansteigender Rhein-Konzentration auf. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass den modifizierenden Enzymen aufgrund des Zellzyklus-Arrests mehr Zeit für die Modifizierung von tRNA-Molekülen zur Verfügung steht. Die Diskrepanz zwischen der Kultivierung über 1 Tag oder 2 Tage könnte darauf zurückgeführt werden, dass Zellen nach Mediumwechsel eine gewisse Zeit für die Akklimatisation benötigen. Während 2 Tage für diesen Prozess ausreichend sind, sind nach 1 Tag noch Anpassungs-Effekte im Modifikationsprofil zu erkennen. Erwähnenswert ist außerdem, dass beide Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Dadurch entsteht Variation sowohl in der Passagen-Anzahl der Zellen als auch in der Verwendung der jeweiligen FBS-Charge. Beides kann einen Einfluss auf die Stressantwort der Zellen hervorrufen. Zudem kann verbesserte Handhabung der Zellen bei der Kultivierung über 2 Tage gegenüber den Zellen, welche lediglich über einen Tag kultiviert wurden, nicht ausgeschlossen werden. Dies liegt an persönlichem Erfahrungszuwachs im Umgang mit Zellkulturen, welcher sich in dem Zeitraum zwischen beiden Experimenten ( $> 1$  Jahr) ergeben hat.

Für ALKBH3-abhängige Modifikationen ( $\text{m}^1\text{A}$ ,  $\text{m}^3\text{C}$  und  $\text{m}^7\text{G}$ ) zeigt sich ein vergleichbarer Effekt. Hier wäre ein verändertes Modifikationsprofil zu erwarten. Bei der Kultivierung über 2 Tage ist kaum eine Änderung des Modifikationsprofils abhängig von der verwendeten Rhein-

Konzentration zu erkennen (**Abbildung 3.18 C**). Alle Werte bewegen sich im Bereich 87–106 %. Hier wäre ein Anstieg, aufgrund der Inhibition der Demethylierung zu erwarten. Bei der Kultivierung über 1 Tag ist dies der Fall. Da dies allerdings auch für  $m^5C$  zutrifft, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt nicht durch die spezifische Inhibition von ALKBH3 zustande kommt. Vielmehr kann erneut die Argumentation des Zellzyklus-Arrests herangezogen werden, wodurch modifizierenden Enzymen mehr Zeit für die Modifizierung von tRNA-Molekülen zur Verfügung steht. Lediglich für  $m^3C$  ist in keinem der Experimente ein Anstieg der Modifikationsmenge zu beobachten.



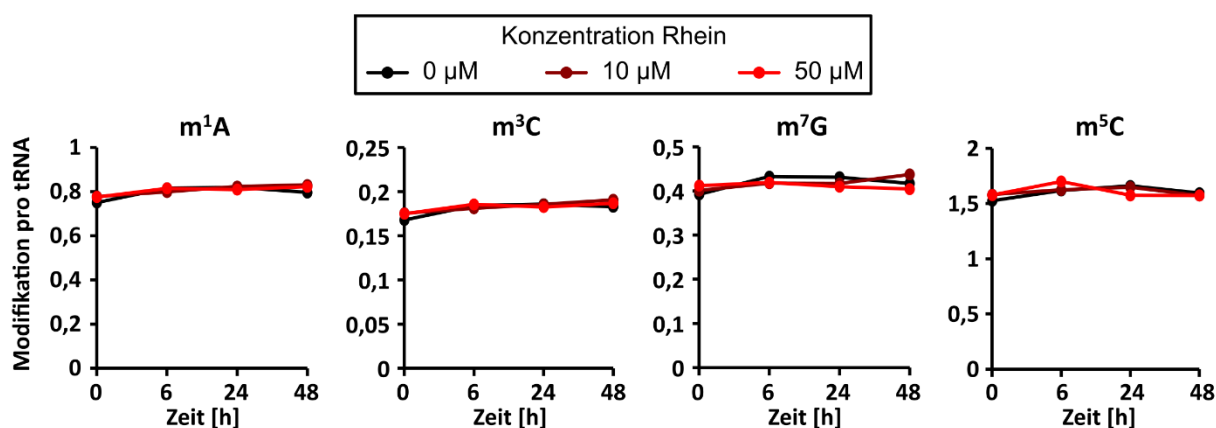
**Abbildung 3.18: Konzentrationsbestimmung von Rhein in Zellkultur.** (A) Strukturformel von Rhein. (B) Effekt von Rhein auf die Modifikationsmenge von  $m^5C$ . Die Modifikationsmenge pro tRNA wurde berechnet und anschließend über die Kontrolle (0 µM) normalisiert. 100% entspricht einer Änderung von 0% gegenüber der Kontrolle. (C) Effekt von Rhein auf die Modifikationsmenge von  $m^1A$ ,  $m^3C$  und  $m^7G$ . Berechnungen erfolgten analog zu  $m^5C$ .

Während nicht ausgeschlossen werden kann, dass Rhein als Inhibitor von ALKBH3 fungiert, weisen die erhobenen Daten auf einen anderen Mechanismus hin. Ein potenzieller Modifikationsanstieg bei höheren Konzentrationen von Rhein könnte auf allgemeine Stressantworten der Zelle, wie etwa den Zellzyklus-Arrest, zurückzuführen sein. You *et al.* zeigten kürzlich, dass die Zugabe von Rhein die Lebensfähigkeit von Zellen verringert und Apoptose hervorrufen

kann.<sup>310</sup> Außerdem konnten vermehrt reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) nachgewiesen werden, bei Mitochondrien war ein Verlust des Membranpotentials zu vermerken und die Translation einiger Proteine wurde beeinflusst. Die Veränderung des Modifikationsprofils bei Zugabe von Rhein kann statt durch spezifische Inhibition von ALKBH3 demnach auch indirekt über eine Kaskade von Stressantworten der Zelle bewirkt werden.

Vorerst wurden die Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  zur Erhebung weiterer Daten ausgewählt. Der Versuchsaufbau gestaltet sich ähnlich wie zuvor, mit dem Unterschied, dass Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet werden. Dies sollte mehr Aufschluss über den Einfluss der Kultivierungsdauer, bei paralleler Anwendung einer niedrigen und hohen Konzentration von Rhein geben. Erneut wurde die Modifikationsmenge von  $\text{m}^1\text{A}$ ,  $\text{m}^3\text{C}$ ,  $\text{m}^7\text{G}$  und  $\text{m}^5\text{C}$  analysiert.

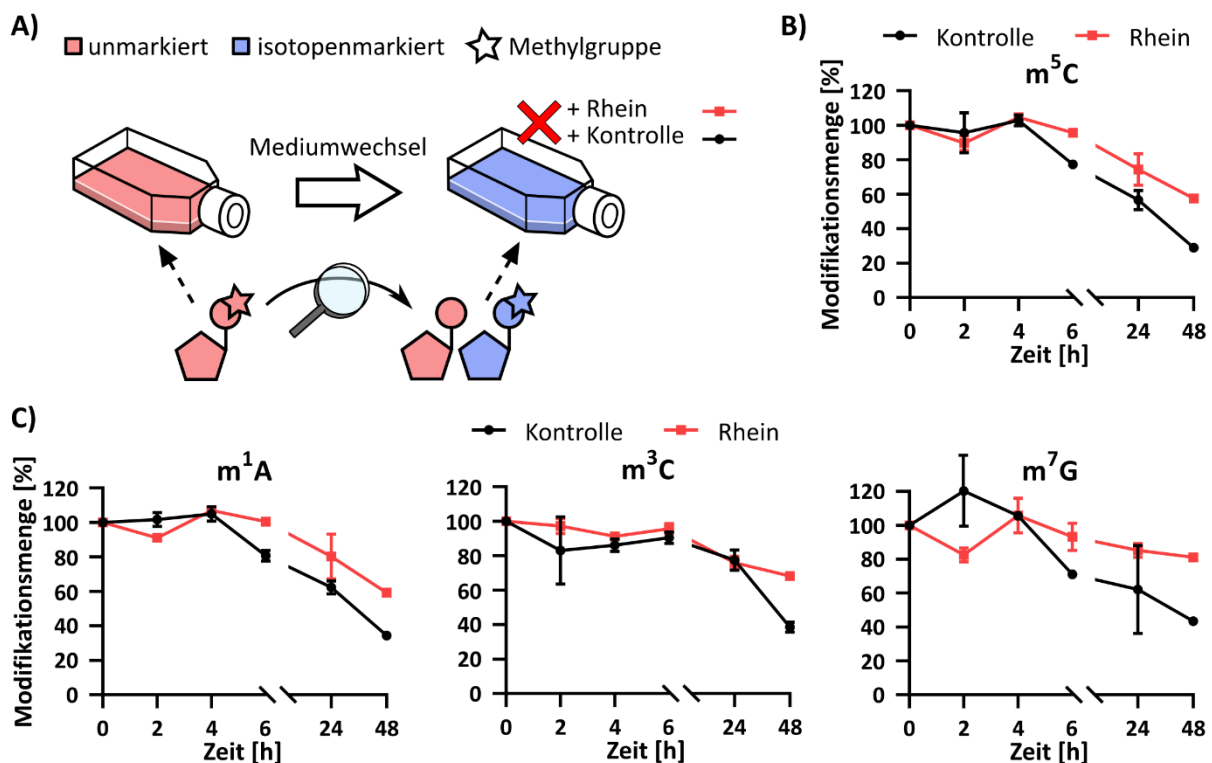
Für keine der analysierten Modifikationen ist eine nennenswerte Veränderung über die Zeit oder abhängig von der Rhein-Konzentration zu erkennen (**Abbildung 3.19**). Dies entspricht den Ergebnissen der Kultivierung über 2 Tage aus dem vorherigen Experiment. Beide Experimente wurden im gleichen Zeitraum durchgeführt, was die höhere Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse erklären könnte. Die absoluten Modifikationsmengen pro tRNA-Molekül befinden sich ebenfalls in einem plausiblen Bereich, wodurch die Stichhaltigkeit der Ergebnisse erhöht wird. Dennoch ist abhängig von Rhein, wider Erwarten keine Veränderung des Modifikationsprofils zu erkennen. Ein Grund hierfür könnte die Maskierung der Demethylierung durch neu entstehende Modifikationen sein. Eine Abnahme der Modifikationsdichte in den Kontroll-Zel-



**Abbildung 3.19: Zeitlicher Verlauf der Modifikationsmenge bei Rhein-Zugabe.** Zellen wurden verschiedenen Konzentrationen an Rhein (0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ) ausgesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 6 h, 24 h, 48 h) geerntet. tRNA wurde über SEC aufgereinigt und nach Verdau zu Nukleosiden über LC-MS/MS analysiert.  $\text{m}^1\text{A}$ ,  $\text{m}^3\text{C}$  und  $\text{m}^7\text{G}$  sind potenzielle Substrate von ALKBH, während  $\text{m}^5\text{C}$  als Kontrolle dient.

len würde somit von der parallelen Modifizierung neuer tRNA-Moleküle verdeckt werden. Andererseits könnte eine Zunahme der Modifikationsdichte in den ALKBH-inhibierten Zellen durch die vermehrte Produktion unmodifizierter tRNA-Moleküle maskiert werden. In beiden Fällen kann durch das Design eines geeigneten NAIL-MS Experiments der jeweilige Störfaktor getrennt analysiert, um somit die Dynamik der originalen tRNA-Moleküle verfolgt werden.

Entsprechend wurden Zellen in unmarkiertem Medium kultiviert. Bei der Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Rhein wurde auf isotonenmarkiertes Medium gewechselt (**Abbildung 3.20**). Alle neu entstehenden tRNA-Moleküle werden somit isotonenmarkiert und können von den originalen, bereits existierenden unterschieden werden. Die Zugabe von  $\text{D}_3$ -Methionin stellt sicher, dass erneute Methylierungsprozesse nicht mit der Verfolgung der originalen methylierten Modifikationen interferiert. Erneut zeigt sich für  $\text{m}^5\text{C}$ , welches kein Substrat von ALKBH3 darstellt, ein zu  $\text{m}^1\text{A}$ ,  $\text{m}^3\text{C}$  und  $\text{m}^7\text{G}$  vergleichbarer Effekt (**Abbildung 3.20 B/C**). In der Kontrolle ist ein Ab-



**Abbildung 3.20: Zeitlicher Verlauf der Modifikationsmenge über NAIL-MS.** (A) Design des NAIL-MS Experiments. Verwendet wurden 50  $\mu\text{M}$  Rhein oder dasselbe Volumen DMSO als Kontrolle. (B) Effekt von Rhein auf die Modifikationsmenge von  $\text{m}^5\text{C}$  (als Kontrolle). Die Modifikationsmenge pro tRNA wurde berechnet und anschließend über die Menge des Zeitpunkts 0 h (100 %) normalisiert. 100 % entspricht daher keiner Änderung gegenüber des Startwertes. (C) Effekt von Rhein auf die Modifikationsmenge von  $\text{m}^1\text{A}$ ,  $\text{m}^3\text{C}$  und  $\text{m}^7\text{G}$ . Berechnungen erfolgten analog zu  $\text{m}^5\text{C}$ . Alle Datenpunkte geben den Mittelwert und die Standardabweichungen aus  $n = 4$  biologischen Replikaten für den Zeitpunkt 24 h und aus  $n = 2$  biologischen Replikaten für die restlichen Zeitpunkte wieder.

sinken der Modifikationsmenge nach 6 h zu verzeichnen. Nach ~ 30 h führt dies zu einer Halbierung der ursprünglichen Modifikationsdichte. Lediglich  $m^3C$  zeigt erneut abweichendes Verhalten. Hier bleibt das Modifikationslevel über längere Zeit konstant und beginnt erst ab 24 h leicht abzusinken. Wie zu erwarten, kann nach 48 h für  $m^1A$ ,  $m^3C$  und  $m^7G$  in der durch Rhein inhibierten Kultur jeweils mehr originale Modifikation nachgewiesen werden. Dies könnte auf die Inhibition von ALKBH3 durch Rhein und die daraus folgende geringere Demethylierungsrate zurückzuführen sein. Da der gleiche Effekt für  $m^5C$  zu verzeichnen ist erscheint dieses Szenario allerdings unwahrscheinlich. Erneut zeichnet sich ab, dass die Zugabe von Rhein zwar Änderungen im Modifikationsprofil hervorruft, dies allerdings nicht auf die gezielte Inhibition von ALKBH3 zurückzuführen ist, sondern auf allgemeine Stressantworten der Zelle.<sup>310</sup> Die Abnahme originaler Modifikationen kann somit sowohl durch aktive Demethylierung als auch durch präferentielle Degradation der modifizierten tRNA-Moleküle hervorgerufen werden. Wird dem Zellkulturmedium Rhein supplementiert kommt es zu einem Zellzyklus-Arrest. Neue tRNA-Moleküle werden kaum noch synthetisiert, originale tRNA-Moleküle zu einem geringeren Ausmaß abgebaut. Die Modifikationsdichte in gestressten Zellen sinkt daher langsamer als in der Kontroll-Kultur.

Es erscheint sinnvoll in zukünftigen Experimenten eine Inhibition von ALKBH3 durch Rhein mit der (vorherigen) Zugabe alkylierender Agenzien wie beispielsweise Methylmethansulfonat (MMS) zu kombinieren. Durch MMS entstehen in erster Linie  $m^7G$ -Schäden an DNA und RNA, aber auch  $m^1A$  und  $m^3C$  Schäden konnten nachgewiesen werden. Eventuell kann ein erhöhtes Level dieser Modifikationen mehr Einblick in die Mechanismen bringen, welche durch die anschließende Zugabe von Rhein ausgelöst werden. Aufgrund der aktuellen Datenlage ist nicht gänzlich klar, ob Rhein eine spezifische Inhibition der ALKBH-Enzyme (hier ALKBH3) bewirkt oder ob die berichteten Effekte<sup>308, 309</sup> durch eine allgemeinere Reaktion der Zellen auf Rhein hervorgerufen wurden.



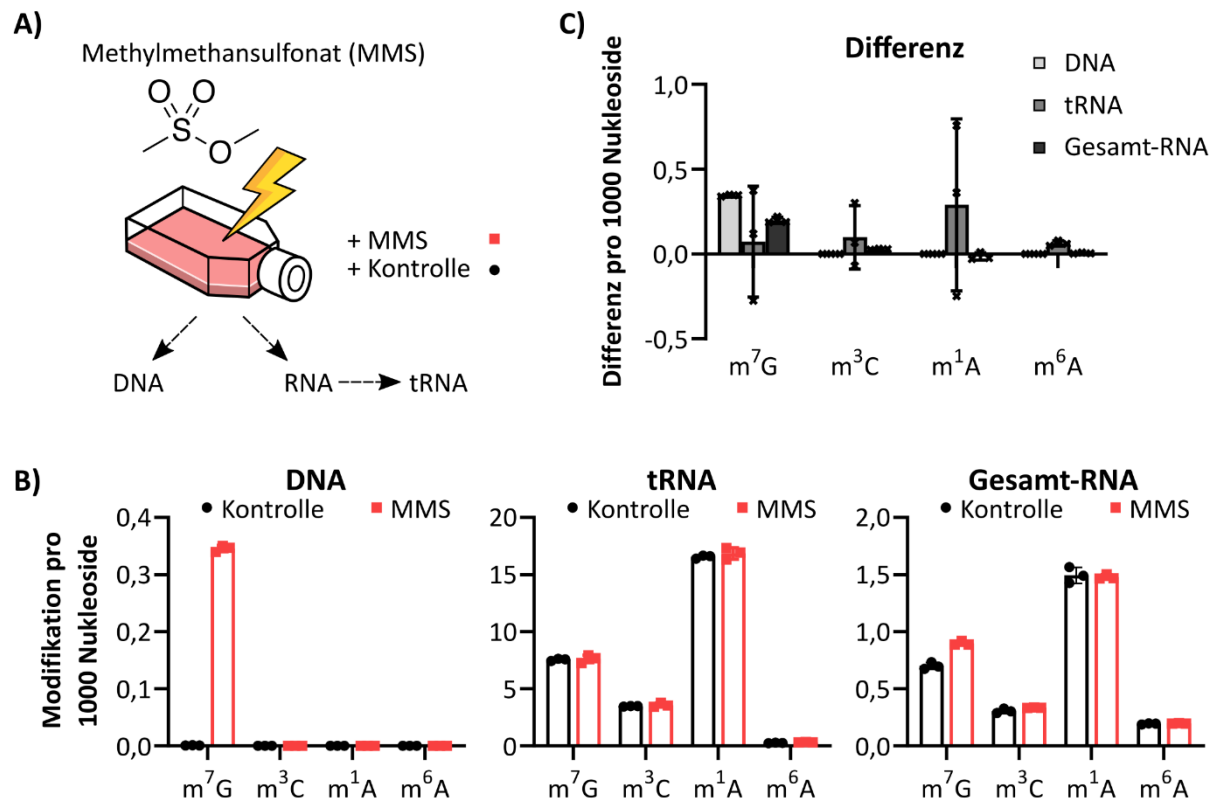
### 3.5.2 Auswirkung von Methylierungs-Stress auf DNA

In Heiss *et al.* (*Nat. Comm.*, **2021**) wurde auf den Effekt alkylierender Agenzien, speziell von Methylmethansulfonat (MMS) auf tRNA-Moleküle eingegangen. MMS wird größtenteils in der Methylierung von DNA angewandt, da dort quantitativ die meisten Schäden entstehen.<sup>311</sup> In RNA werden weitaus weniger Nukleoside methyliert, weshalb für die Detektion dieser in Heiss *et al.* die Anwendung von NAIL-MS notwendig war. Der Unterschied im Ausmaß der Methylierungs-Schäden zwischen DNA- und RNA-Molekülen soll im Folgenden direkt miteinander verglichen werden. Nach der Inkubation mit 1 mM MMS wurde daher sowohl die DNA als auch die RNA aus derselben Kultur aufgereinigt. Als Kontrolle diente eine Kultur, welche mit einer äquivalenten Menge an PBS inkubiert wurde. (**Abbildung 3.21 A**). DNA und RNA wurden analog zu Nukleosiden verdaut und die Modifikationsmenge von  $m^7G$ ,  $m^3C$ ,  $m^1A$  und  $m^6A$  pro 1000 Nukleoside ermittelt. In DNA wurden die entsprechenden Desoxynukleoside analysiert, welche der Einfachheit halber im folgenden Abschnitt und den dazugehörigen Abbildungen direkt mit den Nukleosiden aus RNA verglichen werden. Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse wurde die Differenz zwischen der mit MMS gestressten Kulturen und der Kontroll-Kulturen gebildet (**Abbildung 3.21 B/C**).

Der primär durch MMS entstehende Schaden ist  $dm^7G$  in DNA. Hier beträgt der Anstieg bei Inkubation mit MMS konstant 0,35 Modifikationen pro 1000 Nukleoside. Da  $dm^7G$  nicht natürlich in DNA vorkommt, kann hier von einem ausgeprägten Effekt gesprochen werden. Für  $dm^1A$  und  $dm^6A$  konnten ebenfalls Signale quantifiziert werden, diese befanden sich jedoch im substöchiometrischen Bereich ( $< 0,001$  Modifikation pro 1000 Nukleoside). Für  $dm^3C$  konnte kein Signal detektiert werden. Bei  $dm^1A$  könnte es sich auch um  $dm^3A$  handeln, welches in DNA in Folge von MMS-Stress entsteht.<sup>311</sup> Aufgrund nicht vorhandenem Standards konnte dies allerdings nicht genauer untersucht werden. Als Kontrolle wurde die Menge von  $dm^5C$  quantifiziert, welches kein Produkt von MMS-Schädigung darstellen sollte. Wie erwartet ist hierfür das Level in DNA recht konstant (**Abbildung S7**).

Während in DNA fast ausschließlich  $dm^7G$  nachgewiesen werden konnte, wurden in tRNA  $m^7G$ ,  $m^3C$ ,  $m^1A$  und geringe Mengen an  $m^6A$  detektiert. Da diese Modifikationen standardmäßig in tRNA inkorporiert werden ist es in unmarkierter Zellkultur kaum möglich den Einfluss von MMS auf die Menge dieser festzustellen. In Heiss *et al.* gelang dies durch die Anwendung von NAIL-MS, im hier gezeigten Experiment kann aufgrund der hohen Varianz im Vergleich zur geringen Änderung jedoch kein Fazit gezogen werden. So ist der Anstieg von 16,6 auf 16,8  $m^1A$  pro 1000 Nukleoside in tRNA zwar ähnlich stark ausgeprägt wie der von  $dm^7G$  in DNA,

die Abweichung zwischen den Replikaten ist allerdings zu hoch um dies als eindeutigen Effekt einordnen zu können. Ähnlich verhält es sich für die anderen Modifikationen in tRNA. Lediglich für  $m^5C$  konnte ein leichter Anstieg in der gestressten Kultur beobachtet werden (**Abbildung S7**). Während  $m^5C$  nicht direkt durch die Schädigung, ausgehend von MMS entstehen sollte, ist es möglich, dass allgemeine Anpassungsreaktionen der Zelle zu diesem Ergebnis führen. Im Gegensatz zu DNA und rRNA, kann das Level von tRNA-Molekülen sehr dynamisch reguliert werden. Eine verringerte Menge an tRNA-Molekülen und damit kanonischen Nukleosiden würde somit die Normalisierung verzerren. Tatsächlich war die Menge an detektierten Nukleosiden in der gestressten Kultur  $\sim 2\times$  geringer und könnte somit den beobachteten Anstieg von  $m^5C$  in tRNA erklären. Im Gegensatz zu  $m^5C$  sind  $m^7G$ ,  $m^3C$ ,  $m^1A$  und  $m^6A$  in tRNA weitaus seltener vertreten. Eine entsprechende Anpassung könnte für diese daher geringer ausfallen.

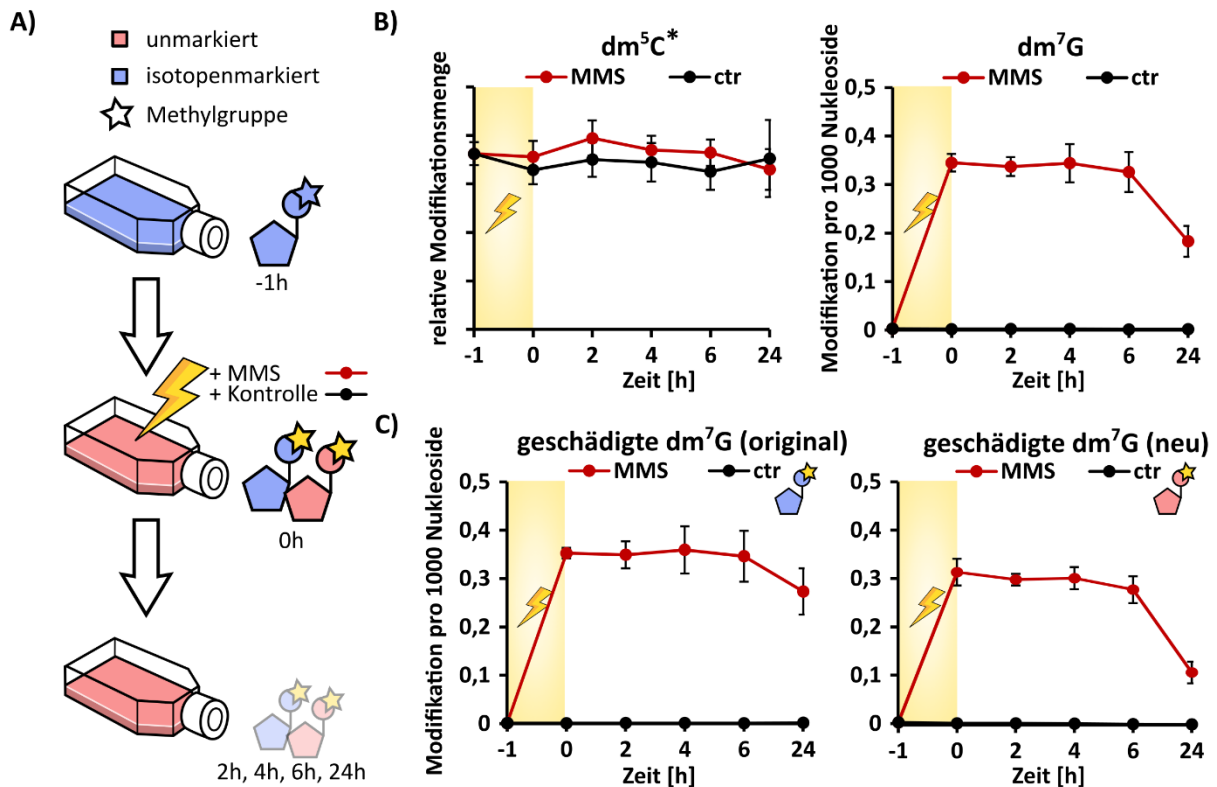


**Abbildung 3.21: Vergleich von MMS-Schäden in DNA und RNA.** (A) Zellen wurden für eine Stunde mit 1 mM Methylnethansulfonat (MMS) gestresst. Anschließend wurden DNA und RNA aus der gleichen Kultur extrahiert. (B) Absolute Modifikationsmenge pro 1000 Nukleoside in DNA, tRNA und Gesamt-RNA in einer Kontrolle und den gestressten Zellen. Die Balken geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von  $n = 3$  biologischen Replikaten wieder. (C) Die absolute Differenz aus gestressten Zellen und der Kontrolle. Die Balken geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von  $n = 3$  biologischen Replikaten wieder. Hierfür dienten 3 Kontroll-Kulturen und 3 MMS-inkubierte Kulturen. Von den Werten je einer gestressten Kultur wurde der Mittelwert der ungestressten Kulturen subtrahiert.

In Gesamt-RNA, welche größtenteils rRNA enthält, scheint wie in DNA ein signifikanter Anstieg von  $m^7G$  in Erscheinung zu treten. So ist in der gestressten Kultur ein Anstieg von 0,2  $m^7G$  pro 1000 Nukleoside zu verzeichnen. Hier wäre eine genauere Untersuchung des Effekts von MMS auf 18S rRNA und 28S rRNA interessant.

In einem weiterführenden Experiment sollte die potenzielle Reparatur von Methylierungsschäden in DNA über NAIL-MS verfolgt werden. Wie bereits in Heiss *et al.* gezeigt, kann eine vollständige Isotopenmarkierung der DNA durch die Zugabe von  $^{15}N_2$ ,  $^{13}C_5$ -Uridin  $^{15}N_5$ -Adenin und  $D_3$ -Methionin erzielt werden. Zellen wurden daher über eine Dauer von 7 Tagen in isoto-penmarkiertem Medium kultiviert. Für die Zugabe von 1 mM MMS wurde auf unmarkiertes Medium gewechselt, welches wiederum nach 1 Stunde Inkubation durch frisches, unmarkiertes Medium ersetzt wurde. Um den potenziellen Abbau der entstandenen Schäden zu verfolgen wurden Zellen nach festgesetzten Zeitpunkten geerntet (**Abbildung 3.22 A**). Die Verwendung von isoto-penmarkiertem Medium zu Beginn des Experiments stellt sicher, dass lediglich Schäden, welche durch direkte Methylierung ausgehend von MMS entstehen, analysiert werden. Potenzielle enzymatische Methylierungen – wie sie in DNA für  $dm^7G$  ohnehin nicht zu erwarten wären – können durch die Zugabe von  $D_3$ -Methionin bei der Auswertung gesondert analysiert werden (wie erwartet konnten diese Isotopologe nicht nachgewiesen werden). Im vorangegangenen Experiment konnte lediglich  $dm^7G$  als maßgebender Schaden in DNA festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte durch das NAIL-MS Experiment bestätigt werden, weshalb im Folgenden auf die Darstellung weiterer MMS-Addukte verzichtet wird. Relative Modifikationsmengen von  $dm^5C$  dienen der Kontrolle.

Zuerst wurde die Summe aller Isotopologe gebildet um ein Experiment ohne Isotopenmarkierung zu simulieren. Ein Vergleich zeigt hier eindeutig, dass das Level an  $dm^5C$  konstant bleibt und sich zwischen der gestressten und der Kontroll-Kultur nicht maßgeblich unterscheidet. Dagegen entsteht, ausgelöst durch MMS, eine signifikante Menge an  $dm^7G$  in DNA (**Abbildung 3.22 B**). Die absoluten Mengen sind vergleichbar mit den zuvor quantifizierten. Erst nach 24 h ist ein Rückgang von ~ 50 % des Schadens zu verzeichnen. Hier stellt sich die Frage nach der molekularen Ursache. Daher wurden die Ergebnisse für originale (isotopenmarkierte) und neue (unmarkierte) DNA-Moleküle getrennt dargestellt (**Abbildung 3.22 C**). Bei der Betrachtung geschädigter originaler DNA-Moleküle fällt auf, dass das Ausmaß des Absinkens nach 24 h weitaus geringer ausgeprägt ist, als es zuvor ohne Beachtung der Isotopenmarkierung der Fall war. In neuen DNA-Molekülen, welche ebenfalls  $dm^7G$ -Schäden aufweisen ist der Rückgang dagegen weitaus stärker ausgeprägt. Dies kann durch die Verdünnung geschädigter DNA



**Abbildung 3.22: NAIL-MS „Pulse-Chase“-Experiment an DNA unter MMS-Stress. (A)** Design des Experiments. Die DNA von Zellen wurde über 7 Tage isotopenmarkiert. Anschließend wurde bei Zugabe von Methylmethansulfonat (MMS) auf unmarkiertes Medium gewechselt. Zellen wurden 1 Stunde mit MMS inkubiert (-1 h – 0 h, gelb hinterlegter Bereich). Anschließend wurde das Medium erneut abgenommen und durch frisches unmarkiertes Medium ersetzt. Zellen wurden nach festgesetzten Zeitpunkten geerntet und die DNA extrahiert. **(B)** Summe aller Isotopologe der jeweiligen Modifikation. \*Für dm<sup>5</sup>C lag zum Zeitpunkt der Datenerhebung kein Standard vor, daher werden hier nur relative Werte angegeben. **(C)** Links: m<sup>7</sup>G Modifikationen welche durch Schädigung originaler Nukleoside entstanden. Rechts: m<sup>7</sup>G Modifikationen welche durch Schädigung neuer Nukleoside entstanden. Die Datenpunkte geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von n = 3 biologischen Replikaten wieder.

durch in den sich teilenden Zellen neu synthetisierte DNA begründet werden. Dieser Effekt kann aufgrund der Isotopenmarkierung für originale DNA-Moleküle vernachlässigt werden. Das Absinken kann dort entweder auf die Reparatur der entsprechenden DNA-Moleküle zurückgeführt werden, oder stellt die Apoptose der betroffenen Zellen, und somit die Degradation der geschädigten DNA dar. Apoptotische Zellen werden aufgrund der Tatsache, dass diese nicht mehr am Boden der Zellkulturschale haften, beim Absaugen des Mediums vor der Ernte entfernt und beeinflussen die Ergebnisse daher nicht. Verbleibende Zellen weisen eine geringere Menge an Schäden auf und verringern somit die vorgefundene Menge an dm<sup>7</sup>G. Einer Reparatur würde durch das Zusammenspiel von Methylpurin-N-Glykosylasen (MPG)<sup>312–315</sup> und der daraus resultierenden Basen-Exzisionsreparatur<sup>316</sup> erfolgen.

Anhand der erhobenen Daten kann nicht geklärt werden welcher der beiden Mechanismen ausschlaggebend für den Rückgang von  $\text{dm}^7\text{G}$  ist. Eine Reparatur der ermittelten Schäden würde erst nach 24 h erfolgen und lediglich ~ 20 % der geschädigten Positionen betreffen. In diesem Fall könnte argumentiert werden, dass entsprechende Schäden zu geringen Ausmaßes sind um eine aktive Demodifizierung durch entsprechende Enzyme einzuleiten. In diesem Szenario scheint ein gewisses Maß an  $\text{dm}^7\text{G}$ -Schäden von der Zelle toleriert zu werden. Somit wäre der Rückgang nach 24 h eher auf das Absterben geschädigter Zellen zurückzuführen.

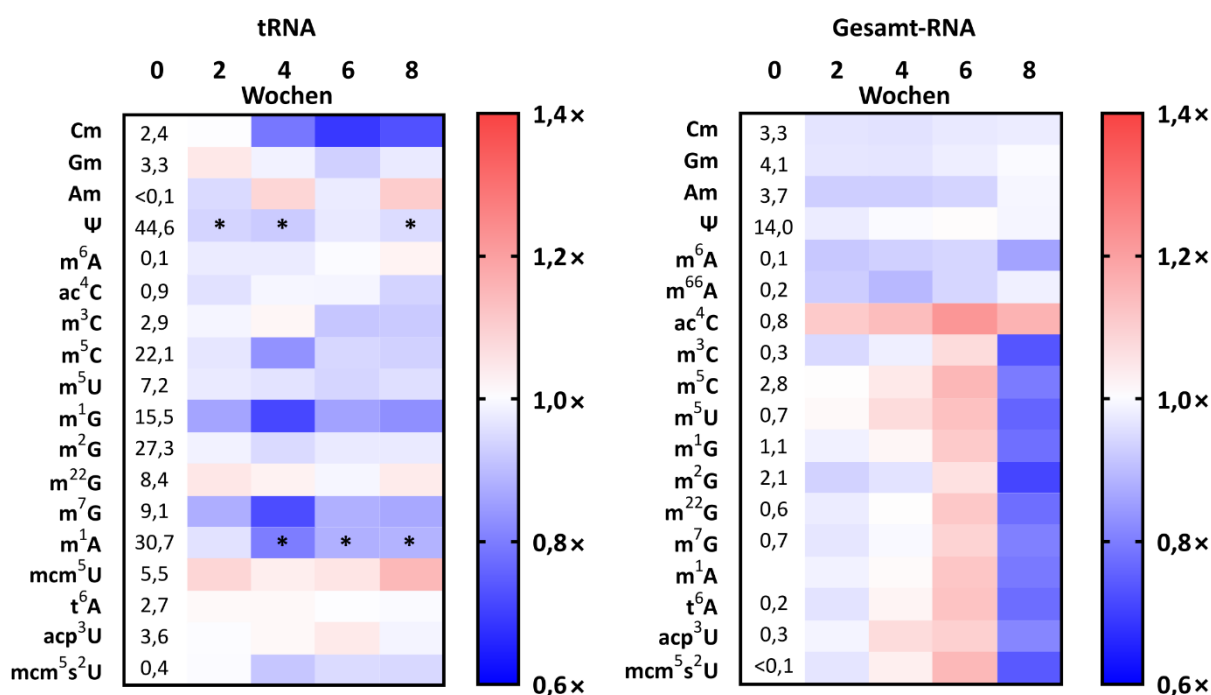
Letztendlich bleibt festzustellen, dass  $\text{dm}^7\text{G}$  in DNA von HEK-293-Zellen den primären, durch MMS hervorgerufenen Schaden darstellt. Dieser ist aufgrund der Abwesenheit von  $\text{dm}^7\text{G}$  in ungestresster DNA selbst ohne NAIL-MS quantifizierbar. Weitere bekannte Schäden monofunktionaler alkylierender Agenzien sind  $\text{dm}^3\text{A}$  und  $\text{dm}^3\text{G}$ .<sup>311, 312</sup> Diese konnten aufgrund fehlender Standards allerdings nicht analysiert werden. Des Weiteren scheint  $\text{m}^7\text{G}$  in rRNA in Folge des Methylierungs-Stresses zu entstehen. Dieses Phänomen sollte auf Reproduzierbarkeit überprüft und gegebenenfalls weiter untersucht werden. Andere Methylierungs-Schäden in RNA können nur durch Anwendung von NAIL-MS quantifiziert werden, da diese sonst im Hintergrund der natürlich vorkommenden Modifikationen nicht analysierbar sind. Besonders interessant ist der Rückgang von  $\text{dm}^7\text{G}$  in DNA nach 24 h. Durch die Anwendung von NAIL-MS kann dies hauptsächlich auf die Verdünnung durch neu entstehende DNA zurückgeführt werden. In originaler DNA kann der weitaus geringere Rückgang sowohl durch Absterben der entsprechenden Zellen, als auch durch Reparatur der geschädigten DNA begründet sein. Zweiteres erscheint aufgrund des geringen Ausmaßes allerdings als eher unwahrscheinlich.

### 3.5.3 Allgemeine Modifikations-Studien

#### Modifikationsdynamik über Passagenanzahl

Zur Untersuchung der Modifikationsdynamik über die Kultivierungsdauer wurden Zellen 2-wöchentlich geerntet. Die Gesamt-RNA, als auch die, über SEC angereicherte tRNA wurden über Nukleosid-MS analysiert. Vor Start des Experiments wurden frisch aufgetaute Zellen eine Woche kultiviert. Die Modifikationsmenge pro 1000 Nukleoside wurde bestimmt und dient der Normalisierung der Ergebnisse aller weiteren Wochen.

Für den Großteil der Modifikationen in tRNA ist kein eindeutiger Trend zu beobachten (**Abbildung 3.23**). Änderungen in der Modifikationsdichte sind zwar zu erkennen, in den seltensten Fällen konnte allerdings eine statistische Signifikanz festgestellt werden. So ist für Cm beispielsweise eine Verringerung von durchschnittlich 27 % nach 4–8 Wochen zu verzeichnen, die Ergebnisse weichen zwischen den einzelnen Experimenten allerdings erheblich voneinander ab. Ursache dafür könnten minimale Unterschiede im verwendeten Medium sein. So können Degradationsprozesse einzelner Komponenten im Medium, als auch die Verwendung einer



**Abbildung 3.23: Modifikationsdynamik über Passagenanzahl.** HEK-293-Zellen wurden 2-wöchentlich geerntet und die tRNA (links) und Gesamt-RNA (rechts) jeweils über Nukleosid-MS analysiert. Der Zeitpunkt Woche = 0 gibt den absoluten Wert der entsprechenden Modifikation pro 1000 Nukleoside eine Woche nach Auftauen der Zellen an. Dieser wurde als Referenz für alle weiteren Wochen verwendet. Mittelwerte für tRNA wurden aus je n = 4 biologischen Replikaten ermittelt (mcm<sup>5</sup>U, t<sup>6</sup>A, acp<sup>3</sup>U und mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U jeweils aus einem Unikat). \* = p < 0,05. Für Gesamt-RNA liegt allgemein nur ein Unikat vor.



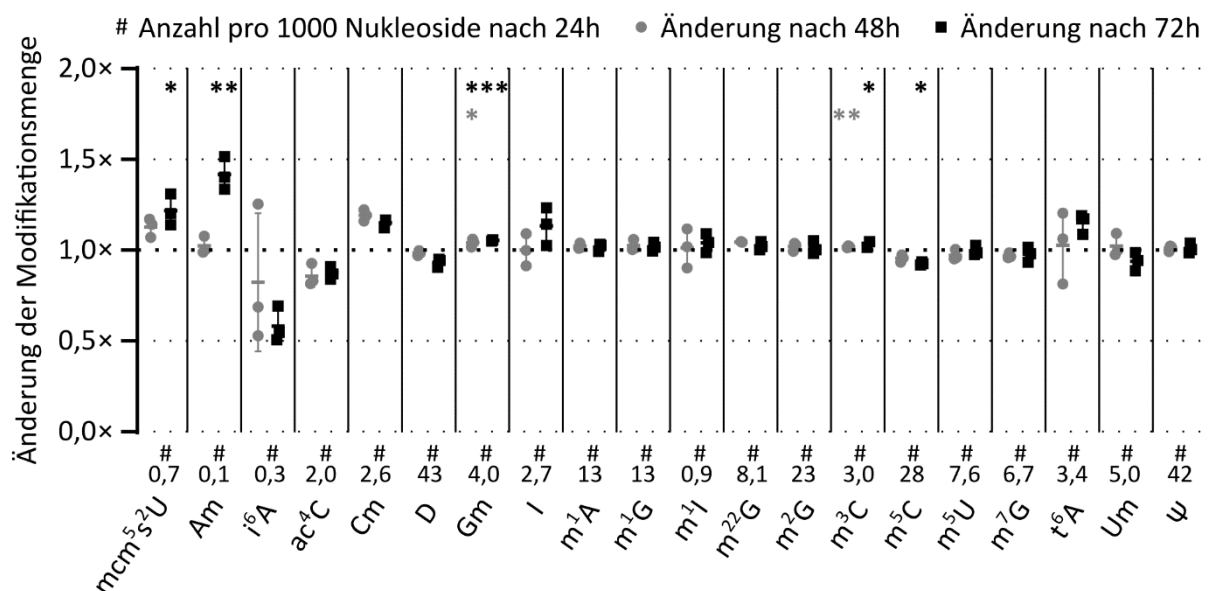
neuen FBS-Charge zu Änderungen im Modifikationsprofil führen. Ähnlich stark ausgeprägt ist dieses Phänomen für m<sup>1</sup>G und m<sup>7</sup>G. Lediglich für Ψ und m<sup>1</sup>A scheinen die ermittelten Änderungen reproduzierbar zu sein. Ψ zeigt eine minimale Verringerung von 4–8 %, bei m<sup>1</sup>A beläuft sich diese sogar auf 5–21 %. Beide Modifikationen werden überwiegend in der TΨC-Schleife der tRNA eingebaut und die Modifizierung von Ψ55 und m<sup>1</sup>A58 ist ein elementarer Schritt in der Prozessierung von tRNA-Molekülen. Eine Abhängigkeit dieser beiden Modifikationen voneinander konnte auch in Barraud *et al.* (*Nat. Comm.*, **2019**) bestätigt werden, eine gleichgerichtete Änderung der Menge scheint demnach schlüssig. Für die Aufklärung der molekularen Ursachen und Folgen sollten daher weitere Untersuchungen herangezogen werden.

Bei der Analyse von Gesamt-RNA, welche sich zu ~ 80 % aus rRNA zusammensetzt, ergibt sich ein gänzlich anderes Bild. Für die Modifikationen Cm, Gm, Am, Ψ, m<sup>6</sup>A, m<sup>66</sup>A und ac<sup>4</sup>C, welche in rRNA vergleichsweise oft vertreten sind, zeigt sich, abgesehen von ac<sup>4</sup>C, kaum eine Änderung über die Kultivierungsdauer. Der Anstieg von ac<sup>4</sup>C findet bereits nach 2 Wochen statt, danach bleibt das Level im Großen und Ganzen konstant. Dahingegen ist für die restlichen Modifikationen ein Anstieg nach 6 Wochen und ein darauffolgender Rückgang nach 8 Wochen zu verzeichnen. Viele dieser Modifikationen werden größtenteils in tRNA-Moleküle inkorporiert und eine Änderung dieser in Gesamt-RNA könnte somit auch eine Änderung des Verhältnisses zwischen rRNA und tRNA widerspiegeln. Nach 6 Wochen wäre ein erhöhtes Level an tRNA vorhanden, welches nach 8 Wochen stark verringert ist. Anpassungen dieser Art können durch vielfache Auslöser begründet sein. Eine Änderung der allgemeinen tRNA-Abundanz kann beispielsweise durch minimale Abweichungen in der Zusammensetzung des Mediums hervorgerufen werden. Dies konnte bereits zuvor in **Kapitel 3.1.2 Einfluss von NAIL-MS auf tRNA-Isoakzeptoren (Northern-Blotting)** festgestellt werden. Während kaum Aufschluss über die Modifikationsdynamik in tRNA gegeben werden konnte, bleibt festzuhalten, dass bei andauernder Kultivierungsdauer der Zellen ein Effekt auf die tRNA-Abundanz vorhanden zu sein scheint.

### tRNA-Modifikationsdynamik über Passagendauer

Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h nach Aussaat geerntet, die tRNA anschließend aufgereinigt und über Nukleosid-MS analysiert. Die Modifikationsmenge pro 1000 Nukleoside wurde für alle Zeitpunkte berechnet und die entsprechenden Werte der 48 h und 72 h Zeitpunkte daraufhin auf die Werte des 24 h Zeitpunkts referenziert. Nach 24 h erreichten Zellen eine Konfluenz von ~ 30 %, nach 48 h ~ 75 % und schließlich 100 % nach 72 h. Für 72 h kultivierte Zellen wiesen aufgrund Platzmangels in der Zellkultur-Flasche zudem bereits einen veränderten Phänotyp auf. Dies äußerte sich in erster Linie durch runde, verkleinerte Zellform.

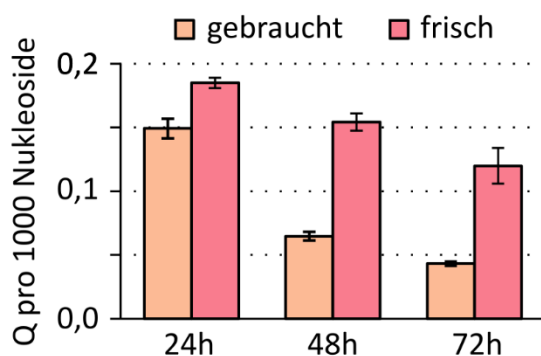
Nur wenige Modifikationen weisen eine Veränderung im Modifikationsprofil abhängig von der Kultivierungsdauer auf (**Abbildung 3.24**). Zahlen unterhalb des Diagramms geben die Anzahl der jeweiligen Modifikation pro 1000 Nukleoside nach 24 h wieder. Für  $mcm^5s^2U$ , welches nur in einigen wenigen tRNA-Isoakzeptoren inkorporiert wird, ist ein leichter Anstieg der Modifikationsmenge nach 48 h zu verzeichnen. Nach 72 h verstärkt sich dieser Effekt und gewinnt an Signifikanz. Hier scheint eine Anpassung der Modifikationsmenge abhängig von der Kultivierungsdauer stattzufinden. Die Isolation und Analyse der entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren im Rahmen eines NAIL-MS Experimentes könnte hier weiteren Aufschluss über die molekularen Mechanismen geben. Am, eine Modifikation, welche ebenso äußerst selten in tRNA-Iso-



**Abbildung 3.24: Modifikationsdynamik über Passagendauer.** Zellen wurden ausgesät und nach 24 h, 48 h und 72 h geerntet. Die tRNA wurde isoliert und über Nukleosid-QQQ analysiert. Die Modifikationsmenge wurde pro 1000 Nukleoside berechnet. Die bei 24 h quantifizierte Menge wird unterhalb des Diagramms angegeben (#). Diese dienen der Normalisierung der jeweils ermittelten Werte nach 48 h und 72 h. Die Datenpunkte geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von n = 3 biologischen Replikaten wieder.

akzeptoren vorzufinden ist, zeigt nach 48 h einen gleichgerichteten, doch deutlich stärker ausgeprägten Effekt. Für Am wurden in vorangegangenen Experimenten jedoch oftmals widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Während eine Anpassung von Am abhängig von externen Faktoren somit wahrscheinlich ist, gestaltete es sich in der Vergangenheit als schwierig einen Trend zu erkennen. Auch hier könnte die Isolation und Analyse entsprechender tRNA-Isoakzeptoren eventuell weitere Einsichten bieten.

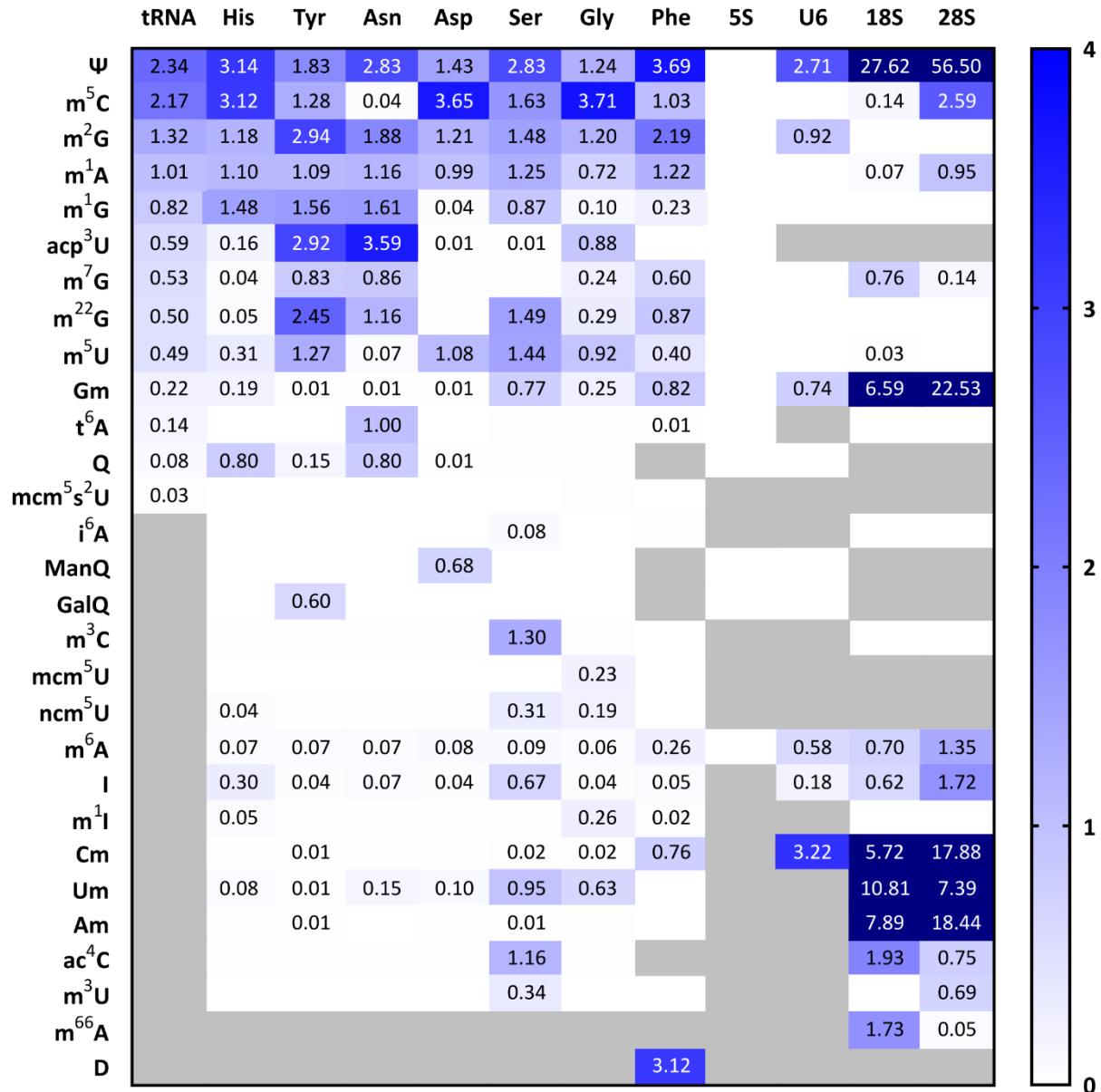
Wie schon zuvor in **Kapitel 3.4 Queuosine-Modifikationen und ihr Auftreten in der Zelle** beobachtet, zeigt sich erneut ein minimaler, aber dennoch eindeutig statistisch signifikanter Anstieg von Gm. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass Zellen für dieses Experiment ohne zusätzliche Supplementierung von Queuin kultiviert wurden. Für die Herstellung des Mediums wurde nicht dialysiertes FBS verwendet, welches eine geringe Menge an Queuin enthält. Schon zuvor wurde gezeigt, dass diese für die volle Modifizierung der Q-Modifikationen nicht ausreichend ist. Das im Medium vorhandene Queuin wird zu Anfang des Experiments in tRNA-Moleküle inkorporiert. Im Laufe der Kultivierung kann eine konstant hohe Menge an Q-Modifikationen in den respektiven tRNA-Isoakzeptoren nicht sichergestellt werden. Eine Verringerung von Queuin im Medium und eine damit verbundene Verringerung von GalQ in tRNA<sup>Tyr</sup> scheint zu einem ausgeprägten Anstieg von Gm zu führen. In einem separaten Experiment sollte untersucht werden, ob ein 24-stündlicher Austausch des Mediums diesen Mangel behebt. In der Kontroll-Kultur wurde das Medium ebenfalls abgenommen, allerdings wieder durch das bereits verwendete ersetzt. Während in beiden Kulturen das Level an Q mit andauernder Kultivierungsdauer abfällt, ist dieser Effekt in der Kultur, welche im Intervall von 24 h mit jeweils frischem Medium kultiviert wurde, um einiges geringer (**Abbildung 3.25**). Für eine ausreichende Menge ist dennoch die zusätzliche Supplementierung von Queuin notwendig. Ein weiterer Effekt, der beobachtet werden kann, ist die Verringerung von m<sup>5</sup>C nach 72 h. Auch hier ist der Mangel von Queuin entscheidend. Die Abwesenheit von ManQ in tRNA<sup>Asp</sup> verringert die Einbaurate von m<sup>5</sup>C38 und führt somit zur ermittelten Abnahme.<sup>23</sup>



**Abbildung 3.25: Dynamik von Q in Standard-Medium.** Zellen wurden in Standard-Medium, ohne zusätzliche Supplementierung von QBase kultiviert. Im Intervall von 24 h wurde das Medium gewechselt. Dieses wurde entweder nur abgenommen und den Zellen direkt wieder zugegeben (gebraucht) oder durch frisches ersetzt (frisch). Balken geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von n = 2 biologischen Replikaten wieder.

#### Modifikationsmengen in aufgereinigten RNA-Molekülen

**Abbildung 3.26** stellt in erster Linie eine Zusammenstellung bereits präsentierter Daten in Tabellenform dar und soll als Referenz für zukünftige Experimente dienen. Alle Zellen wurden, falls nicht anders vermerkt in Standard-Medium (DMEM D6546 – siehe **Kapitel 5.2 Zellkulturmethoden**) mit Standard-FBS und zusätzlicher Supplementierung von 50 nM Queuin kultiviert. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurden 28S rRNA, 18S rRNA, kleine RNAs (80–300 Nukleotide) und tRNA-Moleküle über Größenausschlusschromatographie (SEC) angereichert. Die einzelnen tRNA-Isoakzeptoren wurden über Oligonukleotid-Hybridisierung aus der tRNA-Fraktion aufgereinigt. Dabei sollte beachtet werden, dass die Reinheit einiger tRNA-Isoakzeptoren über Sequenzierung auf < 90 % bestimmt wurde (siehe **Kapitel 3.4.2 Effekt von Queuosin auf andere Modifikationen**). Insbesondere tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Gly</sup> konnten nicht effektiv voneinander getrennt werden (~ 45 % tRNA<sup>Asp</sup>). Aus diesem Grund wurden zur Aufreinigung dieser beiden tRNA-Isoakzeptoren neue DNA-Oligonukleotide geordert, anhand welcher die genaue Modifikationsmenge der beiden tRNA-Isoakzeptoren erneut ermittelt werden sollte. 5S rRNA und U6 snRNA wurden analog aus der Fraktion der kleinen RNAs aufgereinigt. Für die Ermittlung der Daten von U6 snRNA und 5S rRNA wurden zum Teil isotoopenmarkierte Zellen verwendet, weshalb die Ergebnisse auch hier mit Vorsicht betrachtet werden sollten. Alle aufgereinigten RNA-Moleküle wurden anschließend zu Nukleosiden verdaut und über Nukleosid-MS analysiert. Für Moleküle mit bekannter Sequenz wurde die Modifikationsmenge pro RNA-Molekül berechnet (siehe **Kapitel 5.4 Analytik**). Lediglich für die durch SEC angereicherte tRNA wurde die Menge pro 60 kanonische Nukleoside ermittelt (~ 1 tRNA-Molekül). Berechnete Werte wurden stets auf zwei Nachkommastellen gerundet und geben den Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten wieder.



**Abbildung 3.26: Modifikationsmenge in aufgereinigten RNA-Molekülen.** Angezeigte RNA-Moleküle wurden über Größenausschlusschromatographie und gegebenenfalls Oligonukleotid-Hybridisierung aufgereinigt, zu Nukleosiden verdaut und über Nukleosid-MS analysiert. Die Menge ist pro RNA-Molekül angegeben (für tRNA pro 60 kanonische Nukleoside). Weiße Felder ohne Zahl stehen für Modifikationen welche zwar analysiert aber < 0,01 Modifikationen pro RNA-Molekül aufwiesen. Grau hinterlegte Modifikationen wurden nicht analysiert. Die Mengen für 5S rRNA und U6 snRNA wurden aus vergleichenden NAIL-MS Experimenten ermittelt. Hier können Ungenauigkeiten aufgrund der verwendeten Isotopenmarkierung nicht ausgeschlossen werden. Alle Zellen wurden in Standard-Medium unter Supplementierung von 50 nM QBBase kultiviert. Werte geben den Mittelwert aus n = 3 biologischen Replikaten wieder. Die relativen Standardabweichungen können **Abbildung S8** entnommen werden.





## 4. Fazit & Ausblick

Alles in Allem kann von einer erfolgreichen Etablierung von NAIL-MS in Zellkultur gesprochen werden. Zwar entsteht aufgrund der Zufütterung von Adenin und Uridin eine geringfügige Anpassung des Modifikationsprofils, dennoch kann durch die etablierte Isotopenmarkierung die Reifung und der Abbau verschiedenster RNA-Moleküle verfolgt werden. Unerwünschte Anpassungen sind vermutlich in erster Linie auf die Verunreinigung des isotopenmarkierten Uridins zurückzuführen, eine genauere Untersuchung dahingehend sollte in Betracht gezogen werden. NAIL-MS beruht auf einem zu SILAC vergleichbaren System. Studien zur Kombination beider Methoden laufen aktuell und könnten für einen Durchbruch in der Forschung von RNA-modifizierenden Enzymen sorgen.

Zeitaufgelöste NMR-Experimente stellen eine orthogonale Alternative zur NAIL-MS Methodik dar, weisen jedoch Limitierungen in der *in vivo* Anwendung auf. Dennoch konnte eine Hierarchie im Einbau von Modifikationen in *S.cerevisiae* tRNA<sup>Phe</sup> festgestellt werden. Dies hebt das dynamische Zusammenspiel vieler Modifikationen und der entsprechenden Enzyme hervor.

Stressexperimente deuten darauf hin, dass ALKBH3 nicht, wie bisher erwartet, von Rhein inhibiert wird. Vielmehr scheint die Zugabe von Rhein in den Zellen eine Kaskade von Reaktionen hervorzurufen, welche letztendlich zu einer Anpassung des Modifikationsprofils führt. Eine Anpassung der m<sup>3</sup>C- und m<sup>1</sup>A-Menge ist demnach nicht primär auf die selektive Inhibition von ALKBH3 zurückzuführen, sondern stellt eine Reaktion der Zelle auf die allgemeine Stressantwort dar. Falls Rhein für die Inhibition von ALKBH3 in Betracht gezogen wird, sollten zuvor weitere Untersuchungen zur Spezifität durchgeführt werden.

In Heiss *et al.* (*Nat. Comm.*, **2021**) wurde der Effekt von MMS auf RNA-Moleküle untersucht. Zuvor wurde MMS größtenteils für die Methylierung von DNA verwendet. Ein direkter Vergleich zwischen MMS-angestrichenen Schäden in DNA und RNA konnte zeigen, dass das Hauptaddukt wie erwartet m<sup>7</sup>dG in DNA ist. Ebenso konnte geklärt werden, dass der Rückgang der m<sup>7</sup>dG-Schäden in DNA größtenteils auf die Verdünnung durch neu entstehende DNA zurückgeführt werden kann. Ob Schäden in bedeutungsvoller Menge von DNA-Molekülen abgenommen werden bleibt unklar. Ein Rückgang der m<sup>7</sup>dG-Menge in originalen DNA-Strängen könnte ebenso auf das Absterben der entsprechenden Zellen zurückgeführt werden. Weitere, nicht in dieser Arbeit untersuchte aber bekannte Schäden in DNA sind m<sup>3</sup>dA und m<sup>3</sup>dG. In zukünftigen Studien sollten diese in die Analytik aufgenommen werden.

#### 4. Ausblick

Eine erhebliche Menge  $m^7G$  entsteht ebenfalls in ribosomaler RNA. Ob der Schaden in 18S rRNA, in 28S rRNA oder in beiden Molekülen entsteht wurde bisher nicht untersucht, sollte jedoch durch zukünftige Experimente geklärt werden. In unmarkierter Zellkultur konnte eine Schädigung an tRNA-Molekülen aufgrund hoher allgemeiner Abundanz der entsprechenden Modifikationen nicht nachgewiesen werden. NAIL-MS Experimente zeigten jedoch auch dort einen deutlichen Anstieg von, durch MMS induziertem  $m^7G$ . Dies zeigt die Stärke und das Potenzial von NAIL-MS auf. Gerade die Untersuchung niedrig-abundanter Modifikationen und deren Dynamik kann durch NAIL-MS gefördert werden.

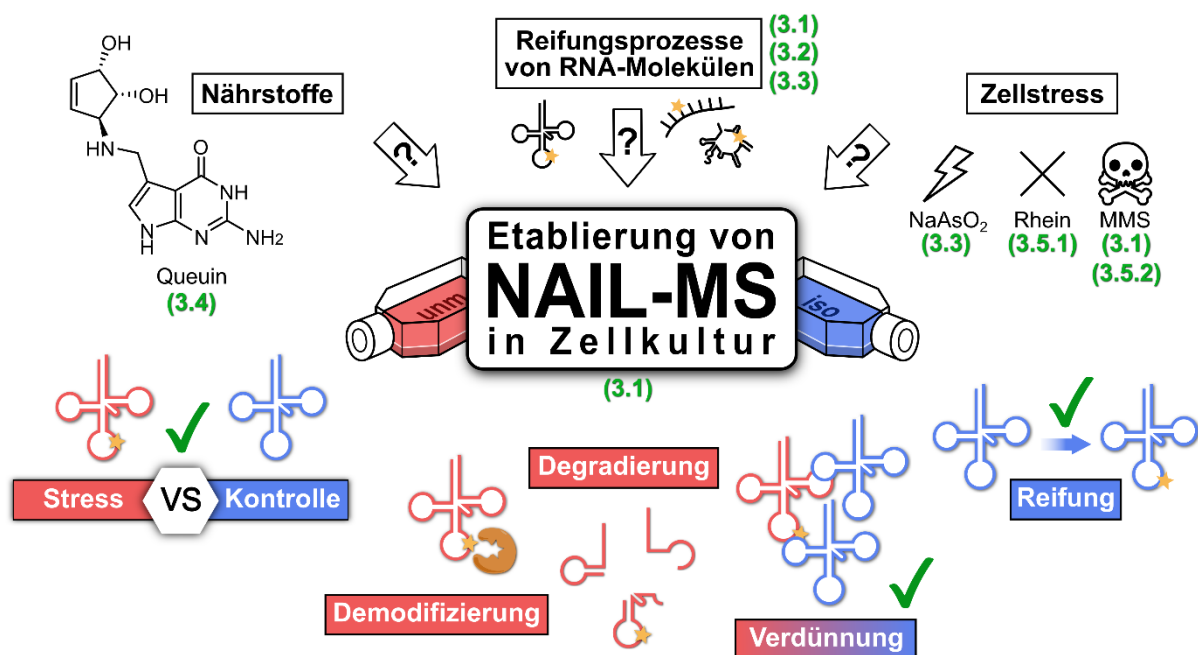
So konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Menge an  $m^5U$  im frühen Lebenszyklus von tRNA-Molekülen weitaus höher als erwartet ist. Eine mögliche Erklärung wäre der Einbau von  $m^5U$  in die entsprechenden tRNA-Isoakzeptoren, welche anschließend im Zuge der Reifung wieder von den RNA-Molekülen abgenommen wird. Eine solche aktive Demodifizierung als Teil des Reifungsprozesses von tRNA-Molekülen wurde bisher nicht beschrieben und wäre eine eindrucksvolle Entdeckung.

Mitunter am interessantesten sind die Untersuchungen zur Supplementierung von Queuin in Zellkultur. Queuin, die Nukleobase von Queuosin, kann von Eukaryoten nicht hergestellt werden und muss daher über die Nährstoffe aufgenommen werden. Ein geringer Anteil befindet sich in Standard-FBS, für eine volle Modifizierung der Q-Modifikationen in Zellkultur ist allerdings eine zusätzliche Supplementierung notwendig. Die Abwesenheit von Queuin in Zellkultur führt offenbar zu einer Anpassung der Q-abhängigen tRNA-Isoakzeptor-Abundanz. Außerdem konnten teilweise erhebliche Unterschiede im Modifikationsprofil festgestellt werden. Besonders die Menge an 2'-O-Methylguanosin (Gm) in  $tRNA^{Tyr}$  steigt beim Fehlen von Queuin stark an ( $10\times$ – $20\times$ ). Obwohl die absolute Menge äußerst gering ist ( $< 0,1$  Gm pro tRNA-Isoakzeptor), kann ohne große Zweifel von einem eindeutigen Effekt gesprochen werden. Auch die Inkorporationsrate von  $m^{22}G$  ändert sich abhängig von der Zufütterung von Queuin. Obwohl final eine identische Modifikationsmenge erreicht wird, kann in tRNA-Molekülen ohne Galaktosyl-Queuosin eine deutlich schnellere Inkorporation von  $m^{22}G$  beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist die sterische Hinderung von TRMT1 durch Galaktosyl-Queuosin.

Einige andere Modifikationen dagegen zeigen eine verbesserte Inkorporationsrate, wenn die jeweilige Q-Modifikation anwesend ist. So konnte gezeigt werden, dass eine größere Menge  $m^5C38$  in  $tRNA^{Asp}$  inkorporiert wird, wenn dem Medium Queuin zugegeben wird. Dieser Effekt manifestiert sich schon bei unvollständiger Modifizierung der Position 34 (ManQ), kann durch NAIL-MS aber dennoch auf die bessere Erkennung des entsprechenden Enzyms der

tRNA aufgrund von ManQ zurückgeführt werden. Ein ähnlicher Effekt wird für  $m^1\Psi$  in tRNA<sup>Tyr</sup> postuliert.  $m^1\Psi$  wurde nicht analysiert, allerdings konnte bei Fehlen von Queuin eine höher als zu erwartende Menge an  $\Psi$  festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung wäre die unvollständige Prozessierung der  $\Psi$ 39-Modifikation zur berichteten  $m^1\Psi$ 39-Modifikation. Diese wäre demnach ebenfalls abhängig von der Zufütterung von Queuin und des entsprechenden Einbaus von GalQ an Position 34. Daher sollte  $m^1\Psi$  und andere weitermodifizierte  $\Psi$ -Modifikationen in zukünftigen Experimenten in die Analytik aufgenommen werden.

Zusammenfassend konnte NAIL-MS in Zellkultur erfolgreich etabliert werden und somit Einblicke in vielfältige molekulare Prozesse bieten (**Abbildung 4.1**). Besonders die Anpassungen des Modifikationsprofils abhängig von der Verfügbarkeit von Queuin im Zellkulturmedium erscheinen interessant und sollten eingehender untersucht werden. Gerade im tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub>-Isoakzeptor treten weitreichende Veränderungen des Modifikationsprofils auf, weshalb sich dieser für weitere Untersuchungen besonders anbietet.



**Abbildung 4.1: Zusammenfassung der Arbeit.** Die Etablierung von NAIL-MS in Zellkultur stand im Mittelpunkt der Arbeit. Mithilfe von NAIL-MS sollte die Auswirkung vom Nährstoffangebot (hier: Queuin) und von Zellstress (hier: Rhein, MMS, NaAsO<sub>2</sub>) auf die Modifikationsdynamik und die allgemeinen Reifungsprozesse von RNA-Molekülen untersucht werden. NAIL-MS ermöglichte die Diskriminierung verschiedener Adaptionenmechanismen. Rot = Medium 1, hier unmarkiert (unm); blau = Medium 2, hier isotopenmarkiert (iso); gelbe Sterne = Modifikationen; grün = entsprechende Kapitelnummern; grüne Häkchen = erfolgreiche Anwendung.



## 5. Material und Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Materialien und Vorgehensweisen beziehen sich auf die unveröffentlichten Ergebnisse. Protokolle zu Materialien und Methoden der veröffentlichten Ergebnisse finden sich direkt in der Publikation unter der Sektion „Materials and Methods“ oder in den jeweiligen Zusatzinformationen. Lediglich interne Hinweise oder detailliertere Beschreibungen zur Durchführung der bereits in den Publikationen beschriebenen Verfahren werden in diesem Abschnitt ergänzt.

### 5.1 Materialien

#### Chemikalien und Nukleoside

Alle Salze und Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) in molekular-biologischer Qualität erhalten. Zellkulturmedien sowie Trypsin und PBS wurden ebenfalls von Sigma-Aldrich erhalten. FBS (dialysiert und nicht dialysiert) wurden von BioWest SAS (Nuaille, Frankreich) bezogen. Die isotopenmarkierten Verbindungen  $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Uridin (Ribose- $^{13}\text{C}_5$ , 98%;  $^{15}\text{N}_2$ , 96–98%) und  $^{15}\text{N}_5$ -Adenin ( $^{15}\text{N}_5$ , 98%) wurden von Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA) bezogen. (D<sub>3</sub>)-L-Methionin (98 Atom-% D) wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Lösungsmittel in LC-MS Qualität (Acetonitril, Isopropanol, Methanol) wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Lösungsmittel in HPLC Qualität wurden von VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Puffer und Chemikalien für TBE-Harnstoff-Gele sowie für Northern-Blot-Analytik wurden ebenfalls von Roth bezogen. SSPE-Puffer (20×) wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Denhardt's Lösung (50×) wurde von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) bezogen. Alle Lösungen und Puffer wurden mit Wasser aus einer Sartorius arium® Pro Reinstwasseranlage (Göttingen, Deutschland) hergestellt. Die Nukleoside Adenosin, Cytidin, Guanosin und Uridin wurden von Sigma-Aldrich erworben. Dihydrouridin (D) wurde von Apollo Scientific (Stockport, UK) erworben. N6-Threonylcarbamoyladenosen ( $t^6\text{A}$ ) wurde von TRC (North York, Kanada) erworben. N6-Dimethyladenosin ( $m^6\text{A}$ ) wurde von Alfa Chemistry (New York, USA) erworben. Queuosin (Q), N3-Methyluridin ( $m^3\text{U}$ ), N6-Isopentenyladenosin ( $i^6\text{A}$ ), 2-Methylguanosin ( $m^2\text{G}$ ) und 5-Methoxycarbonylmethyluridin ( $mcm^5\text{U}$ ) waren großzügige Geschenke des Dedon-Labors. 1-Methylinosin ( $m^1\text{I}$ ) war ein großzügiges Geschenk von STORM Therapeutics LTD (Cambridge, UK). Galaktosyl-Queuosin war ein großzügiges Geschenk des Carell-La-

## 5.1 Materialien

bors. 3-(3-Amino-3-carboxypropyl)uridin (acp<sup>3</sup>U) wurde von Christoph Borek aus dem eigenen Arbeitskreis (AK Kellner) synthetisiert. Alle weitere RNA-Nukleoside wurden von Carbo-synth (Newbury, UK) erworben. 1-Methyldesoxyadenosin (m<sup>1</sup>dA) und 3-Methyldesoxycytidin (m<sup>3</sup>dC) wurden von Jena BioScience (Jena, Deutschland) bezogen. 6-Methyldesoxyadenosin (m<sup>6</sup>dA) wurde von Carbosynth bezogen. Alle anderen Desoxynukleoside wurden von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Für alle hier nicht ausgewiesenen Materialien wird die Herkunft im jeweiligen Kapitel angegeben.

### Geräte

**Tabelle 5.1: Geräteliste**

Gerät	Genaue Bezeichnung
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific Heracell™ VIOS 160i CO <sub>2</sub> -Inkubator mit Edelstahlkammer
LaminarFlow Hood	Thermo Scientific Safe 2020
automatischer Zellzähler	Invitrogen Countess® II automated cell counter
HPLC	Agilent 1100 HPLC System
LC-MS/MS	Agilent 1260 Infinity II LC System Agilent 6470A QQQ mit Jet Stream ESI-Quelle
SpeedVac	Genevac EZ-2 Plus Evaporating System
Nanophotometer	Implen NanoPhotometer® N60
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer
Thermocycler	SensoQuest Labcycler
Voltmeter (PAGE)	Pharmacia Biotech Elektrophorese Netzteil EPS 600
Voltmeter (NB)	BioRad PowerPac™ HC High-Current Power Supply
UV-Crosslinker	Stratagene Stratalinker® UV Crosslinker 1800
Schüttel-Inkubator (NB)	BioSan Orbital Shaker-Incubator ES-20
Imaging-Gerät (NB)	Amersham Imager 680 blot and gel imager
HRMS	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC System Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL mit HESI-Quelle



## Medien und Stocklösungen für Zellkultur

- „Standard-Medium“: 44 mL DMEM D6546, 5 mL FBS (nicht dialysiert ODER dialysiert), 1 mL L-Glutamin (50×), 5 µL Queuin (10.000×)
- „Spezial-Medium“: 42,4 mL DMEM D0422, 5 mL FBS (meist dialysiert), 1 mL L-Glutamin (50×), 1 mL Adenin (50×), 500 µL Uridin (100×), 100 µL Methionin (500×), 40 µL Cystin (1250×), 5 µL Queuin (10.000×)
- „Quenching-Medium“: 45 mL DMEM D6546 ODER DMEM D4022, 5 mL FBS (nicht dialysiert ODER dialysiert)
- „Auftau-Medium“: 39 mL DMEM D6545, 10 mL FBS (nicht dialysiert), 1 mL L-Glutamin (50×), 5 µL Queuin (10.000×)
- „2× Kryo-Stock“: 8 mL FBS (nicht dialysiert), 2 mL DMSO

\* Gegebenenfalls wurde dem Standard-Medium zusätzlich Adenin und Uridin supplementiert. Entsprechend hing die Wahl von nicht dialysiertem oder dialysiertem FBS von der Gestaltung des Experiments ab und wird jeweils explizit angegeben.

\*\* Quenching-Medium dient dem Quenching von Trypsin bei der Subkultivierung von Zellen und wurde mit den zum jeweiligen Experiment passenden Medium und FBS hergestellt. Somit können insbesondere bei den isotoopenmarkierten Varianten von Adenin und Uridin Einsparungen vorgenommen werden.

**Tabelle 5.2: Herstellung der Stocklösungen für die Verwendung in Zellkultur.** Aliquots von Glutamin, Uridin und Queuin wurden bei –20 °C gelagert. Alle weiteren Stocklösungen wurden bei 4 °C gelagert. Einwaagen sind für die jeweilige Konzentration der unmarkierten Varianten angegeben. Bei Verwendung der isotoopenmarkierten Varianten wurde die Einwaage entsprechend angepasst. Alle Stocklösungen wurden nach der Herstellung steril filtriert und gegebenenfalls aliquotiert. Die nötige Verdünnung in Zellkulturmedium ist in Klammern angegeben.

Stocklösung		Herstellung
200 mM	Glutamin (50×)	292 mg in 10 mL MilliQ-Wasser
325 mM	Cystin (1250×)	157 mg in ~ 1 M HCl (1 mL HCl konz. + 11 mL MilliQ-Wasser)
100 mM	Methionin (500×)	153 mg in 10 mL MilliQ-Wasser
5 mM	Adenin (50×)	6,8 mg in 10 mL MilliQ-Wasser
20 mM	Uridin (100×)	24,4 mg in 5 mL MilliQ-Wasser
0,5 mM	Queuin (10.000×)	1,4 mg in 10 mL MilliQ-Wasser

### **SEC-Puffer**

In eine saubere 1 L Labor Gewindeflasche wurden 7,7 g  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (molekular-biologische Qualität) gegeben und mit 1000 mL hochreinem Wasser aufgefüllt, sodass eine 1 M Lösung vorlag.

### **20× SSC Puffer**

Zu 2 mL einer 1,5 M Trinatriumcitrat-Lösung (pH 7,0) wurden 1,75 g NaCl zugegeben. Es wurde mit reinem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 mL aufgefüllt. Endkonzentrationen: Trinatriumcitrat-Lösung (300 mM), NaCl (3 M). Andere Konzentrationen des SSC Puffers wurden durch entsprechende Verdünnung des 20× SSC Puffer mit MilliQ-Wasser hergestellt.

### **1× B&W Puffer**

584 mg NaCl wurden mit 38,5  $\mu\text{L}$  einer 1M EDTA Lösung und 50  $\mu\text{L}$  einer 1 M Tris-HCl Lösung (pH 7,5) vereint. Dieses Gemisch wurde mit hochreinem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 mL gebracht. Endkonzentrationen: NaCl (1 M), EDTA (0,5 mM), Tris-HCl (5 mM).

### **4× Hybridisierungs-Puffer (MBN)**

2,98 g HEPES und 1,86 g KCl wurden in 45 mL 5 % (v/v) DMSO gelöst und mit 1 M HCl auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde mit 5 % (v/v) DMSO auf ein Gesamtvolumen von 50 mL aufgefüllt. Endkonzentrationen: 0,25 M HEPES, 0,5 M KCl, 5 % (v/v) DMSO, pH 7

### **12 % TBE-Harnstoff-Gel**

24 mL Gelkonzentrat wurden mit 11 mL Gelverdünner, 5 mL Pufferkonzentrat und 10 mL MilliQ-Wasser gemischt. (Bei Ersatz von 10 mL MilliQ-Wasser durch die gleiche Menge Gelverdünner wird eine Harnstoff-Konzentration von 50 % (w/v) anstatt von 40 % (w/v) erhalten.) Für die Herstellung von 2 Gelen wurde zu 20 mL dieser Mischung 200  $\mu\text{L}$  APS (100 g/L) gegeben, die Lösung vermischt und anschließend 20  $\mu\text{L}$  TEMED hinzugegeben. Nach erneuter Mischung wurde die Lösung bei Raumtemperatur zügig zwischen die zuvor installierten Glasplatten im Gelgießstand gegeben und mit einem Zehn-Taschenkamm für 20 min polymerisiert. Polymerisierte Gele wurden bis zu Verwendung in feuchtes Zellulose-Papier gewickelt und bei 4 °C in einem verschließbaren Plastikbeutel aufbewahrt (maximal 1 Monat).

**Hybridisierungs-Puffer (NB)**

5 mL einer 10 % SDS-Lösung (w/v) wurden mit 23,5 mL MilliQ-Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 5 mL Denhardt's Lösung (50×) wurden 16,5 mL SSPE-Puffer (20×) zugegeben. Vor der Benutzung wurde der Hybridisierungs-Puffer (NB) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 100 rpm inkubiert, bis sich alle Bestandteile komplett gelöst haben. Endkonzentrationen: 1 % (w/v) SDS, 5× Denhardt's Lösung, 6,6× SSPE-Puffer.

**Wasch-Puffer (NB)**

50 mL SSPE-Puffer (20×) wurden mit 425 mL MilliQ-Wasser verdünnt und anschließend 25 mL 10 % SDS-Lösung (w/v) zugegeben. Vor der Benutzung wurde der Wasch-Puffer (NB) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 100 rpm inkubiert, bis sich alle Bestandteile komplett gelöst haben. Endkonzentrationen: 0,5 % (w/v) SDS, 2× SSPE-Puffer.

**LC-MS/QQQ Puffer**

In eine saubere 1 L Labor Gewindeflasche wurden 0,385 g  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (LC-MS Qualität,  $\geq 99\%$ , VWR), gegeben und mit 1000 mL hochreinem Wasser aufgefüllt (Endkonzentration 5 mM). Zur Einstellung des korrekten pH-Werts (5,3) wurden 65  $\mu\text{L}$  Essigsäure (HiPerSolv CHROMANORM for LC/MS, Essigsäure 99 %, VWR Chemicals) zugegeben.

**LC-MS/HRMS Puffer**

In eine saubere 1 L Labor Gewindeflasche wurden 0,771 g  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (LC-MS Qualität,  $\geq 99\%$ , VWR), gegeben und mit 1000 mL hochreinem Wasser aufgefüllt (Endkonzentration 10 mM, pH 7).

### 5.2 Zellkulturmethoden

Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 10 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert. Medien und Lösungen wurden vor Benutzung auf 37 °C erwärmt. Für Subkultivierungen wurde die Konfluenz über mikroskopische Betrachtung bestimmt.

#### Kryokonservierung von Zelllinien

Für die Kryokonservierung von HEK-293-Zellen wurde diese in 2× T75 Zellkulturflaschen kultiviert und anschließend trypsinisiert (3 mL Trypsin pro Flasche). Jeweils 12 mL Standard-Medium wurde zugegeben, die Zellen resuspendiert und die Konzentration bestimmt. Zellen wurden zentrifugiert (130× g, 3 min) und in der entsprechenden Menge Standard-Medium resuspendiert um eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/mL zu erhalten. Die gleiche Menge 2× Kryo-Stock wurde vorsichtig zugegeben um eine finale Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/mL zu erhalten. Je 1 mL der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei –70 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™) gelagert. Zellen wurden am nächsten Tag in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt.

#### Revitalisierung von Zelllinien

Für die Revitalisierung von Zelllinien wurde 1 mL gefrorene Zellsuspension bei 37 °C schnellstmöglich aufgetaut. Diese wurde vorsichtig in 5 mL vorgewärmtes Auftau-Medium überführt und anschließend zentrifugiert (130× g, 3 min). Das Zellpellet wurde in Auftau-Medium resuspendiert und in einer T25 Zellkulturflasche kultiviert. Für eine folgende Subkultivierung wurde ebenfalls Auftau-Medium verwendet.

#### Subkultivierung

Die an der Zellkulturflasche haftenden Zellen wurden vorsichtig mit 5 mL PBS gespült, um einerseits abgestorbene Zellen loszuwerden und andererseits inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsin-Aktivität zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen für 2 min in 1 mL Trypsin bei 37 °C inkubiert. Mit 4,5–7 mL Quenching-Medium (je nach gewünschter Subkultivierung) wurde die Zellsuspension homogenisiert und anschließend 1 mL davon zentrifugiert (130× g, 3 min). Das Zellpellet wurde in 5 mL frischem Medium resuspendiert und in einer T25 Zellkulturflasche kultiviert. Es wurde stets eine Subkultivierung bei einer Konfluenz von ~ 90 % angestrebt. Subkultivierungen wurde in der Regel montags, mittwochs und freitags vorgenommen.

### **Stressexperimente**

Für die Aussaat von Zellen für Stressexperimente (Rhein, MMS, etc.) wurde die Zelldichte mithilfe des automatischen Zellzählers bestimmt. Nach einer Kultivierung von mindestens 24 h aber höchstens 48 h wurde der jeweilige Stressfaktor durch einen entsprechenden Wechsel des Mediums zugegeben. Auf einen PBS-Spülschritt wurde – falls nicht anders vermerkt – verzichtet. Falls aufgrund des experimentellen Designs ein erneuter Mediumwechsel nötig war, wurde dieser analog durchgeführt. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass das ursprüngliche Medium restlos abgenommen wird.

## 5.3 Biochemische Methoden

### Isolation der Gesamt-RNA

Für die Extraktion von RNA wurden Zellen nach Absaugen des Mediums direkt in TRI Reagent® aufgenommen (1 mL pro 25 cm<sup>2</sup>, 0,5 mL für kleinere Flächen). Die Zellsuspension wurde 20 Sekunden gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das 0,2-fache Volumen an Chloroform (bspw. 200 µL Chloroform pro 1 mL TRI Reagent®) wurden zugegeben und sorgfältig gevortext, bis eine einheitlich trübe Mischung entstand. Nach 5 min wurde die Mischung zur vollständigen Phasentrennung 10 min bei 10.000× g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit identischem Volumen Isopropanol vermischt (bspw. 500 µL wässrige Phase + 500 µL Isopropanol). Nach Fällung der RNA bei –20 °C über Nacht wurde die Lösung bei 12.000× g und 4 °C für mindestens 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet vorsichtig mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (12.000× g, 4 °C, 5–10 min). Nach sorgfältiger Abnahme des Ethanols wurde das RNA-Pellet in ~ 30 µL MilliQ-Wasser resuspendiert.

### RNA-Aufreinigung über SEC

Für die Aufreinigung von tRNA und Gesamt-rRNA wurde Größenausschlusschromatographie (SEC) verwendet. Als mobile Phase diente SEC-Puffer. Eine AdvanceBio SEC 300 Å 2,7 µm, 7,8 × 300 mm Säule ermöglichte die Trennung von tRNA von Gesamt-rRNA unter Verwendung einer isokratischen Elution bei 1 mL/min und einer Säulentemperatur von 40 °C. Nach Äquilibrieren der Säule für mindestens 30 min wurde bis zu 100 µg der Gesamt-RNA injiziert. Die großen rRNA-Untereinheiten eluieren von 3,5–4,8 min und die tRNA von 6,9–7,9 min. Diese Zeiten wurden mit ansteigendem Alter der Säule geringfügig angepasst.

Für die Aufreinigung von 18S rRNA und 28S rRNA wurde eine AdvanceBio SEC 1000 Å 2,7 µm, 7,8 × 300 mm Säule verwendet. Sonstige Parameter sind die gleichen wie zuvor. 28S rRNA eluiert von 5,0–7,2 min und 18S rRNA von 7,5–8,5 min.

Die gewünschten Fraktionen wurden gesammelt und mit einer SpeedVac auf 30–50 µL aufkonzentriert. Ein 0,1-faches Volumen NH<sub>4</sub>OAc (5 M) und 1 µL GlycoBlue™ (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) und anschließend das 2,5-fache Volumen an eiskaltem Ethanol (100%) wurden zugegeben. Nach Fällung der RNA bei –20 °C über Nacht wurde die Lösung bei 12.000× g und 4 °C für mindestens 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet vorsichtig mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (12.000× g, 4 °C, 5–



10 min). Nach sorgfältiger Abnahme des Ethanols wurde das RNA-Pellet in ~ 30 µL MilliQ-Wasser resuspendiert.

### RNA Aufreinigung über Oligonukleotid-Hybridisierung

Die Aufreinigung spezifischer RNA-Moleküle erfolgte über Oligonukleotid(ON)-Hybridisierung. Ein angepasstes Protokoll von Hauenschild *et al.*<sup>317</sup> wurde verwendet. Ein ~ 30 Nukleotide langes, zur Sequenz der Ziel-RNA revers komplementäres Oligonukleotid, das über einen kurzen AAA-Adapter synthetisch mit einem Biotin-Tag versehen wurde, wurde für jedes aufzureinigende RNA-Molekül entworfen. Die Sequenzen können **Tabelle 5.3** entnommen werden. Pro aufzureinigende Probe wurden 25 µL Dynabeads™ Streptavidin (T1 oder C1, bei der Verwendung von M270 und M280 wurde die doppelte Menge verwendet) in einem Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. Über eine magnetische Halterung werden die Dynabeads™ am Gefäßrand konzentriert und die klare Lösung anschließend abpipettiert. Die Dynabeads™ wurden so anschließend 3-mal mit je 25 µL pro Ansatz 1× B&W Puffer gewaschen und zusätzlich einmal mit 25 µL 5× SSC Puffer pro Ansatz.

**Tabelle 5.3: Oligonukleotide für die RNA-Aufreinigung.** Die Identität gibt das aufzureinigende RNA-Molekül an. \*Interne Kennnummer in der Oligo-Datenbank des AK Kellner (Stand 2021)

Identität	Kennnummer*	Sequenz (5' – 3')
tRNA <sup>His</sup> <sub>GUG</sub>	SK06	[Btn]TGCCGTCACCTCGGATTCTGAACCGAGGTTGCTG
tRNA <sup>Tyr</sup> <sub>GUA</sub>	SK123	[Btn]AAATGGTCCTTCGAGCCGGAATCGATCCAGCGA
tRNA <sup>Asn</sup> <sub>GUU</sub>	SK102	[Btn]AAATGGCGTCCCTGGGTGGGCTCGAACCACCAACCTTTT·CGGTTAACAGCC
tRNA <sup>Asp</sup> <sub>GUC</sub>	SK03	TGGCTCCCCGTCGGGGAATTGAACCCGGTCTCCCGCGT·GACAGGCGGGGATACTAACCCTATACTAACGAGGAAAA[Btn]
tRNA <sup>Ser</sup> <sub>UGA</sub>	SK22	[Btn]AAATTTCAAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACGACTAC
tRNA <sup>Gly</sup> <sub>GCC</sub>	SK05	[Btn]TGCAATTGGCCGGGAATCGAACCCGGGGCCTC
tRNA <sup>Phe</sup> <sub>GAA</sub>	SK97	[Btn]AAATGGTGCCGAAACCCGGGATCGAACCAGGGT
5S rRNA	SK149	[Btn]AAACCGACCCTGCTTAGCTTCCGAGATCAGACG
U6 snRNA	SK124	[Btn]AAAAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTCATCCTTGC

Es wurde 1 µL Biotin-DNA-Oligo (100 µM) in ein Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. 1–1,5 µg in MilliQ-Wasser gelöste angereicherte RNA wurde zugegeben. Für die Aufreinigung von

tRNA-Isoakzeptoren wurde tRNA verwendet. Für die Aufreinigung von 5S rRNA und U6 snRNA wurden über SEC angereicherte RNA-Moleküle der Länge ~ 80–300 Nukleotide verwendet. Nach der Zugabe von 25 µL 20× SSC Puffer wurde das Gesamtvolumen durch Auffüllen mit MilliQ-Wasser auf 100 µL erhöht. Das Gemisch wurde zur Denaturierung der RNA für 3 min bei 95 °C erhitzt und danach direkt in einen Heizblock bei 65 °C überführt und dort 10 min inkubiert. Nach anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur (~ 3 min) wurde jedem Ansatz 25 µL äquilibrierte Dynabeads™ in 5× SSC Puffer zugegeben (T1 oder C1, bei der Verwendung von M270 und M280 wurde die doppelte Menge verwendet). Der Ansatz wurde 30–60 min bei 25 °C bei 600 rpm inkubiert. Nicht hybridisierte RNA wurde durch Abnehmen des Überstandes unter Verwendung der magnetischen Halterung entfernt. Die Dynabeads™ wurden einmal mit 50 µL 1× SSC Puffer gewaschen, 3-mal mit 25 µL 0,1× SSC Puffer und anschließend in 20 µL MilliQ-Wasser angelöst. Nach Inkubation bei 75 °C für 3 min wurde die von den Dynabeads™ getrennte RNA-haltige Lösung in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt.

#### **Isolation der DNA**

Für die Extraktion von DNA wurden Zellen trypsiniert und anschließend pelletiert (130× g, 3 min). Die DNA wurde über das genomische DNA Aufreinigungs-Kit von NEB (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt.

#### **RNA/DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die RNA-Ausbeuten wurden mit Hilfe eines Nanophotometers bestimmt. Dazu wurde die gefällte RNA in hochreinem Wasser angelöst und 1 µL zur Konzentrationsbestimmung verwendet.

#### **Bioanalyzer-Messungen**

Nach Vorbereitung der jeweiligen Agilent RNA Chips (6000 Pico RNA Chip oder Small RNA Chips) gemäß den Anleitungen des Herstellers wurden jeweils 1 µL der entsprechend verdünnten Proben auf den jeweiligen Chip aufgetragen und im Agilent 2100 Bioanalyzer mit den vorinstallierten Methoden „Eukaryote Total RNA Pico Series II.xsy“ bzw. „Small RNA Series II.xsy“ gemessen.

### Verdau für Nukleosid-Analytik

Ein Master-Mix zum Verdau zu Nukleosiden kann gemäß **Tabelle 5.4** für die entsprechende Anzahl an Proben hergestellt werden.  $\text{MgCl}_2$  und TRIS sind Bestandteile des Puffersystems. Benzonase und SPD (engl. snake venom diesterase) sind Nukleasen und CIP (engl. calf intestine phosphates) die Phosphatase. Pentostatin und THU (Tetrahydrouridin) schützen die Nukleoside vor Desaminierung und BHT (Butylhydroxytoluol) wirkt als Antioxidans. Für den hier gezeigten Master-Mix müssen 15  $\mu\text{L}$  Probe mit 15  $\mu\text{L}$  Master-Mix verdaut werden. Bei abweichenden Volumina wurde die Menge an  $\text{MgCl}_2$  und TRIS entsprechend angepasst. Alle weiteren Angaben beziehen sich auf den Verdau von 10  $\mu\text{g}$  RNA und müssen/können nur bei einer Erhöhung/Verringerung der RNA-Menge angepasst werden. Nach Verdau für 2 h bei 37 °C wurden alle Proben mit ~ 50 Vol % LC-MS Puffer verdünnt (bspw. 30  $\mu\text{L}$  Verdau + 15  $\mu\text{L}$  LC-MS Puffer). Mit jeder Probe wurde 1  $\mu\text{L}$  SILIS (10 $\times$ ) co-injiziert (bspw. 9  $\mu\text{L}$  Probe + 1  $\mu\text{L}$  SILIS). Der Verdau von DNA erfolgte analog und die Messung wurde entsprechend mit eigens hergestelltem DNA-SILIS durchgeführt. Für die Herstellung des DNA-SILIS wurden Hefe-Zellen mit MMS gestresst, die DNA isoliert, zu Nukleosiden verdaut und als 10 $\times$  DNA-SILIS präpariert.

**Tabelle 5.4: Beispielhafter Master-Mix für den Verdau von RNA.** Der gezeigte Master-Mix bezieht sich auf den Verdau von 15  $\mu\text{L}$  Probe mit 15  $\mu\text{L}$  Master-Mix. 10  $\mu\text{g}$  RNA oder DNA werden innerhalb von 2 h bei 37 °C zu Nukleosiden verdaut.

Substanz	Stammlösung	Zielkonzentration	1x	50x
$\text{MgCl}_2$	10 mM	→ 1 mM	3 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
TRIS pH = 8	50 mM	→ 5 mM	3 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
Benzonase	1 U/ $\mu\text{L}$	→ 2 U	2 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
CIP (Alk.Phos.)	1 U/ $\mu\text{L}$	→ 2 U	2 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
SPD (PDE1)	0,1 U/ $\mu\text{L}$	→ 0,2 U	2 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Pentostatin	1 mg/mL	→ 1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
THU	5 mg/mL	→ 5 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
BHT	10 mM	→ 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

### **Mung-Bean-Nuklease(MBN)-Verdau**

50 pmol aufgereinigte 18S rRNA (~ 32 µg) und 500 pmol zur Zielsequenz revers komplementäres DNA-Oligonukleotid (ON, Sequenz: CCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTC) wurden in einem 0,33-fachen Volumen an 4× Hybridisierungs-Puffer (MBN) aufgenommen (bspw. 31 µL 18S rRNA + 5 µL ON + 12 µL Puffer). In einem Thermocycler wurde der Reaktionsansatz für 5 min auf 90 °C erhitzt und dann über eine Dauer von 2 h langsam von 90 °C auf 45 °C gekühlt (0,375 °C pro Minute). Anschließend wurden dem Ansatz 2 U MBN (2 µL), 100 ng RNase A (5 µL) und ~ 10 Vol % 10× MBN Puffer (hier: 6 µL) zugegeben und 1 h bei 35 °C inkubiert (MBN, RNase und MBN-Puffer von NEB, Ipswich, MA, USA). RNase A wurde durch Erhitzen auf 90 °C für 2 min inaktiviert. Nicht verdaut RNA wurde direkt mit TRI Reagent® (200 µL) und Chloroform (40 µL) unter Zuhilfenahme von GlycoBlue™ gefällt (siehe RNA-Aufreinigung).

### **Probenvorbereitung für Oligonukleotid-MS**

RNase T1 wurde auf 10 U/µL verdünnt, indem 2 µl der RNase T1 Stammlösung (186 U/µL, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) mit 35,2 µl TRIS pH 7,5 (25 mM) gemischt wurden (verdünnte RNase T1 wurde bei 4 °C gelagert). 3 µg RNA wurde mit RNase T1 bei 37 °C für 1 h in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit Endkonzentrationen von 10 mM TRIS pH 7,5, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U/µl RNase T1 und 0,02 U/µl CIP verdaut. Die verdauten Proben wurden durch einen Cut-Off-Filter mit einem Molekulargewicht von 10 kDa (VWR, Dreieich, Deutschland,) filtriert.

### **TBE-Harnstoff-PAGE**

12% TBE-Harnstoff-Gele (Herstellung s.o.) wurden für 20 min bei einer konstanten Spannung von 200 V vorgewärmt. 1–1,5 µg Gesamt-RNA (7,5 µg für tRNA<sup>His</sup> Analyse) in 10 µL Volumen wurden mit 10 µL 2× Ladepuffer (90 % Formamid) vermischt und anschließend für 1 min bei 90 °C inkubiert. Das volle Volumen (20 µL) wurde dann direkt in die Gel-Taschen eines 12% TBE-Harnstoff Gels geladen. Zusätzlich wurde in mindestens eine freie Tasche 6 µL 2x RNA-Ladefarbstoff (NEB, Ipswich, MA, USA) gegeben. Laufbedingungen sind 45–60 min (blauer Farbstoff nahezu am unteren Ende des Gels), 275 V bei Raumtemperatur in 1× TBE Puffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

### Northern-Blotting

Nach TBE-Harnstoff-PAGE wurde das Gel entnommen und unter Verwendung von drei „Whatman® Blotting Paper“ auf jeder Seite über Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran (Amersham Hybond™-N+) übertragen. Als Blotting-Puffer wurde, der zuvor bereits für PAGE verwendete TBE-Puffer verwendet und mit MilliQ-Wasser auf ~ 0,8× verdünnt. Laufbedingungen sind 2 h, 380 mA bei 4 °C. Anschließend wurde die transferierte RNA durch UV-Bestrahlung auf der Nylonmembran fixiert. Hierfür wurde die Membran auf einem feuchten „Whatman® Blotting Paper“ mit der RNA-Seite nach oben zeigend im UV-Crosslinker positioniert und 2 min mit einer Wellenlänge von 254 nm und einer Energie von 120 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Membran wurde anschließend 20 min bei 37 °C und 100 rpm in einem Schüttelinkubator in Hybridisierungs-Puffer (NB) inkubiert. 100 pmol eines zur Zielsequenz revers komplementären Oligonukleotids, an das an beide Enden ein Cyanin3-Farbstoff gekoppelt ist, wurde zugegeben und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide können **Tabelle 5.5** entnommen werden. Die Membran wurde unter Lichtausschluss anschließend zweimal für je 10 min mit Wasch-Puffer (NB) bei 100 rpm und Raumtemperatur gewaschen, bevor die Signale an einem Imaging-Gerät über eine Anregung bei 520 nm visualisiert wurden.

**Tabelle 5.5: Oligonukleotide für Northern-Blotting.** Die Identität gibt das zu detektierende RNA-Molekül an. Cy3 = Cyanin3-Farbstoff, \*Interne Kennnummer in der Oligonukleotid-Datenbank des AK Kellner (Stand 2021)

Identität	Kennnummer*	Sequenz (5' – 3')
tRNA <sup>His</sup> <sub>GUG</sub>	SK154	[Cy3]AAATGCCGTCACCTCGGATTCGAACCGAGGTTGCAAA[Cy3]
tRNA <sup>Tyr</sup> <sub>GUA</sub>	SK156	[Cy3]AAATGGTCCTTCGAGCCGGAATCGATCCAGCGAAAA[Cy3]
tRNA <sup>Asn</sup> <sub>GUU</sub>	SK155	[Cy3]AAATGGCGTCCCTGGGTGGGCTCGAACCACCAACCTTT-TAAA[Cy3]
tRNA <sup>Asp</sup> <sub>GUC</sub>	SK153	[Cy3]AAACCGCGTGACAGGCGGGGATACTAACCA-CTATACTAACGAGGAAAA[Cy3]
tRNA <sup>Ser</sup> <sub>UGA</sub>	SK145	[Cy3]TTTCAAGTCCATCGCCTTAACCA-CTCGGCCACGACTAC[Cy3]
tRNA <sup>Gly</sup> <sub>GCC</sub>	SK146	[Cy3]CAGGCGAGAATTCTACCACTGAACCACCAATGC[Cy3]
tRNA <sup>Phe</sup> <sub>GAA</sub>	SK144	[Cy3]TGGTGCCGAAACCCGGGATCGAACCAGGGT[Cy3]
5S rRNA	SK149	[Cy3]AAACCGACCCTGCTTAGCTTCCGAGATCAGACG[Cy3]
U6 snRNA	SK143	[Cy3]AAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-TCCTTGC[Cy3]

## 5.4 Analytik

### Sequenzierung

Die Reinheit über Sequenzierung wurde durch milde RNA-Fragmentierung unter stark alkalischen Bedingungen (5 min, 96 °C, pH 9,2) durchgeführt. Die resultierenden Fragmente wurden durch Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) 3'-dephosphoryliert und durch PNK/ATP-Behandlung 5'-phosphoryliert. Die Erstellung einer Sequenzierungs-Bibliothek erfolgte über das NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set für Illumina (NEB) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Qualität der Bibliothek wurde mit dem HS-DNA-Chip am Bioanalyzer 2100 bewertet. Die Sequenzierung wurde mit HiSeq1000 im Single-Read-SR50-Modus durchgeführt. Um die angepasste Sequenz zu entfernen wurden die resultierenden Rohdaten (~ 10 Mio./Probe) mit trimmomatic v.032 getrimmt, und mit bowtie2 an der Referenz, welche menschliche rRNA-Sequenzen und eine nicht redundante Teilmenge menschlicher tRNAs enthält, ausgerichtet.

### Nukleosid-MS (QQQ)

Die Trennung der Nukleoside erfolgte über eine Synergi Fusion-RP-Säule (Synergi® 2,5 µm Fusion-RP 100 Å, 150 × 2,0 mm, Phenomenex®, Torrance, CA, USA). Als Puffer wurden LC-MS/QQQ Puffer (Puffer A) und pures Acetonitril (Puffer B) verwendet. Der Gradient beginnt mit 100 % Puffer A für 1 min, gefolgt von einem Anstieg auf 10 % Puffer B über eine Dauer von 4 min. Puffer B wird dann über 2 min auf 40 % erhöht und für 1 min beibehalten bevor über eine Dauer von 0,5 min wieder auf 100 % Puffer A gewechselt und die Säule für 2,5 min re-equilibriert wird. Die Gesamtzeit beträgt 11 min und die Flussrate 0,35 mL/min bei einer Säulentemperatur von 35 °C.

Für die Ionisierung der Nukleoside wurde eine ESI Quelle verwendet (ESI-MS, Agilent Jetstream). Die Gastemperatur (N<sub>2</sub>) lag bei 230 °C mit einer Flussrate von 6 L/min. Die Sheath-Gastemperatur lag bei 400 °C mit einer Flussrate von 12 L/min. Die Kapillarspannung (capillary voltage) lag bei 2500 V, die Skimmer-Spannung bei 15 V, die Düsenspannung (nozzle voltage) bei 0 V und der Vernebelungsdruck (nebulizer pressure) bei 40 Psi. Die Zellbeschleunigungsspannung (cell accelerator voltage) lag bei 5 V. Alle Methoden wurden im DMRM- und positiven Ionenmodus durchgeführt. Die Fragmentorspannung und die Kollisionsenergie wurden für jedes Nukleosid spezifisch optimiert. Optimierte Parameter befinden sich zusammen mit den Retentionszeiten und den Massenübergängen unmarkierter und isotoopenmarkierter



Nukleoside in **Tabelle S4** für RNA-Nukleoside und **Tabelle S5** für DNA-Nukleoside. Die MS1-Auflösung wurde jeweils auf „Wide“ und die MS2-Auflösung auf „Unit“ gesetzt und der SILIS-Übergang jeweils direkt als interner Standard ausgewiesen.

## Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden synthetische Nukleoside eingewogen und in Wasser auf eine Stammkonzentration von 1–10 mM gelöst. Die Kalibrierlösungen reichten von 0,025 pmol bis 100 pmol für jedes kanonische Nukleosid und von 0,00125 pmol bis 5 pmol für jedes modifizierte Nukleosid. Die Konzentrationen von Ψ und D reichten von 0,005 pmol bis 20 pmol. Analog zu den Proben wurde mit jeder Kalibrierung 1 µL SILIS (10×) co-injiziert. Die Erstellung der Kalibriergerade und die entsprechende Auswertung der Proben erfolgte über die quantitative MassHunter Software von Agilent. Das Prinzip der Quantifizierung mithilfe eines SILIS wird in Borland *et al.*<sup>270</sup> genauer beschrieben.

## Normalisierung / Berechnung pro RNA-Molekül

Um verschiedene Proben quantitativ vergleichbar zu machen, wurde die molare Menge jedes modifizierten Nukleosids auf die molare Menge der Summe der injizierten kanonischen Nukleoside referenziert und anschließend – falls nicht anders ausgewiesen – pro 1000 kanonische Nukleoside angegeben. In einzelnen Fällen wurden Modifikationen in Gesamt-tRNA auf 60 kanonische Nukleoside referenziert, um die Modifikationsmenge in einem durchschnittlichen tRNA-Molekül anzugeben. Bei bekannter Sequenz des RNA-Moleküls (bspw. tRNA-Isoakzeptoren) wurde auf die Menge an RNA-Molekülen ( $n_{RNA}$ ) normiert, um die Anzahl der Modifikationen pro RNA-Molekül zu erhalten. Dazu wurden die berechneten Mengen der injizierten kanonischen Nukleoside (bspw.  $n_C$ ) gemäß **Gleichung 5** durch ihre zu erwartende Menge (#) im jeweiligen RNA-Molekül dividiert und anschließend gemittelt. Die Zahlen für jedes kanonische Nukleosid (#) wurden aus der Sequenz der RNA-Moleküle entnommen.

$$(5) \quad n_{RNA} = \frac{\frac{n_C}{\#C} + \frac{n_U}{\#U} + \frac{n_G}{\#G} + \frac{n_A}{\#A}}{4}$$

Im Falle der NAIL-MS Experimente wurden die verschiedenen Isotopologe auf ihre entsprechend markierten kanonischen Nukleoside referenziert, so dass ursprüngliche (unmarkierte) Modifikationen auf die ursprünglichen RNA-Moleküle und neue (isotopenmarkierte) Modifikationen auf neue RNA-Moleküle referenziert wurden.

### HRMS von Oligonukleotiden

Die Trennung der Oligonukleotide erfolgte über eine Synergi Fusion-RP-Säule (Synergi® 2,5 µm Fusion-RP 100 Å, 150 × 2,0 mm, Phenomenex®, Torrance, CA, USA). Als Puffer wurden LC-MS/HRMS Puffer (Puffer A) und pures Acetonitril (Puffer B) verwendet. Der Gradient beginnt bei 0 % Puffer B und steigt bis 10 min auf 5% Puffer B und anschließend bis 12 min auf 50 % Puffer B an. Nach 1 min bei 50 % Puffer B wurde über eine Dauer von 1 min zu 100 % Puffer A umgespült. Die Säule wurde für 4 min bei 100 % A re-equilibriert. Die Gesamtzeit beträgt 18 min und die Flussrate 0,35 mL/min bei einer Säulentemperatur von 35 °C.

Hochauflösende Massenspektren der Oligonukleotid-Ionen wurden mit einem Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL mit einer beheizten Elektrospray-Ionisationsquelle (HESI) aufgenommen, die im positiven Ionisationsmodus mit einer Kapillarspannung von -10 V und einer Temperatur von 310 °C betrieben wurde. Die Sprühspannung wurde auf 3,3 kV und die Temperatur für die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) auf 135 °C eingestellt. Sheath-, Auxiliary- und Sweep-Gase wurden auf 5, 35 und 7 „arbitrary Units“ eingestellt. MS1-Spektren wurden von 400 bis 2000 m/z aufgenommen und die datenabhängige Erfassung (DDA, engl.: data dependent acquisition) wurde so eingestellt, dass MS2-Spektren der beiden häufigsten Ionen mit einer Vorläufer-Ionenliste von 636,1, 646,4, 742,5, 756,2, 953,7, 969,2, 1113,2 und 1133,7 erfasst wurden. Die MS2-Fragmentierung verwendete CID mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 35. Die Datenerfassung und -analyse erfolgte mit der Softwareplattform Thermo Xcalibur.

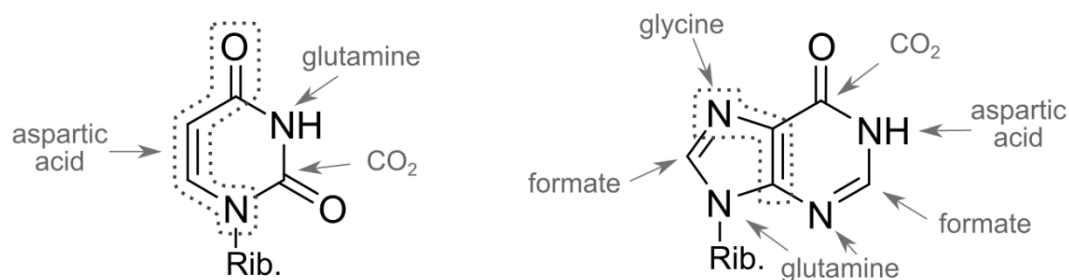
## 6. Anhang

### 6.1 Zusätzliche Daten

**Tabelle S1: Kürzel aller gängigen funktionalen Gruppen in RNA-Modifikationen.** Die Kürzel können kombiniert werden, um komplexere RNA-Modifikationen zu beschreiben.

Abkürzung	volle Gruppenbezeichnung
ac	acetyl
acp	amminocarboxypropyl
ca	carboxyl
chm	carboxyhydroxymethyl
cmo	glyoxylat
cmnm	carboxymethylaminomethyl
f	formyl
g	glycinyll
gal	galactosyl
ge	geranyl
glu	glutamyl
hn	hydroxynorvalylcarbamoyl
ho/hm	hydroxy/hydroxymethyl
i	isopentenyl
io	<i>cis</i> -hydroxyisopentenyl
m	methyl
man	mannosyl
mchm	carboxyhydroxymethyl methylester
mcm	methoxycarbonylmethyl
mcmo	glyoxylat methylester
mnm	methylaminomethyl
mo	methoxy
ncm	carbamoylemethyl
n	amino
r(p)	5-O-phosphono-b-D-ribofuranosyl
s	thio
se	seleno
t	threonylcarbamoyl
tm	taurinomethyl

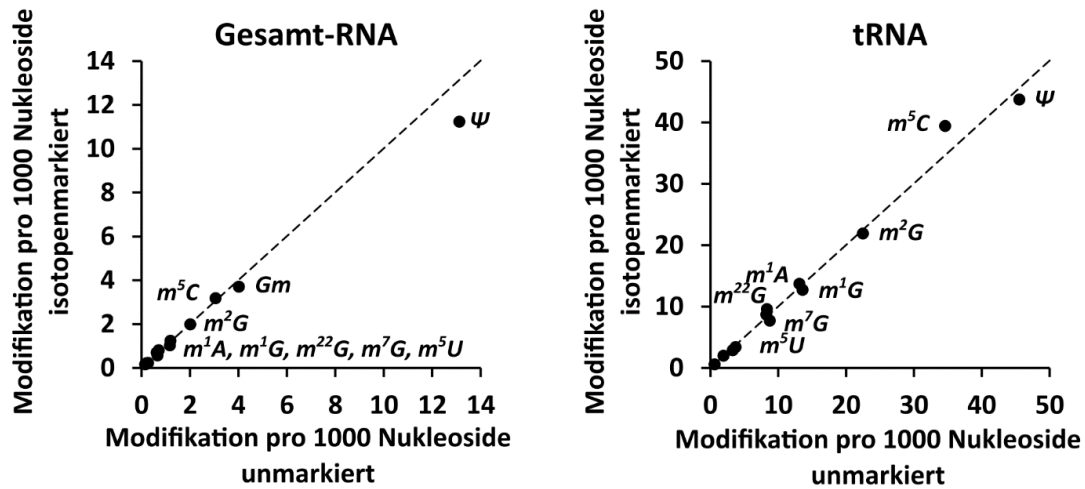
## 6.1 Zusätzliche Daten



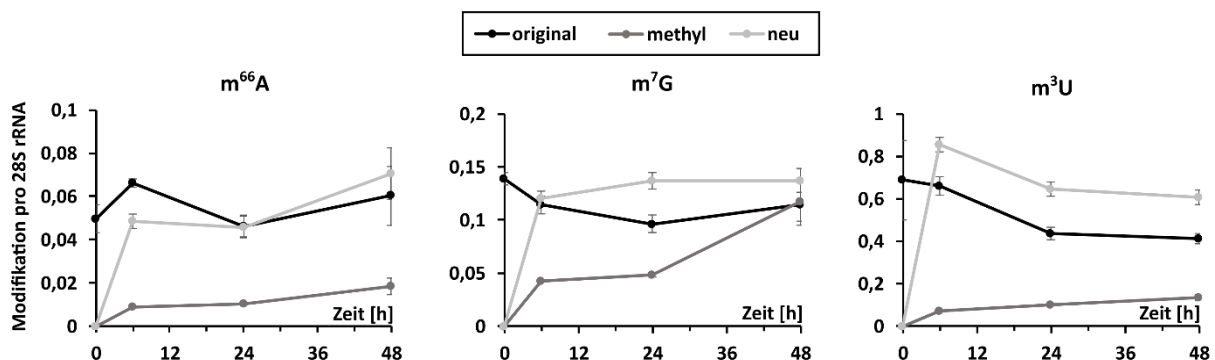
**Abbildung S1: Biosynthese von Nukleosiden.** Die Nukleoside werden in der Zelle aus den gezeigten Metaboliten (grau), welche an den gezeigten Stellen eingebaut werden (graue Pfeile), synthetisiert.

**Tabelle S2: Modifikationsprofil in unmarkierten und isotonenmarkierten Isoakzeptoren.** Die Daten stammen aus einem vergleichenden NAIL-MS Experiment. Grau hinterlegt = unmarkiert, hellgrau hinterlegt = isotonenmarkiert. Modifikationen mit einer Abundanz < 0.01 pro RNA-Molekül werden nicht ausgewiesen.

	His	Tyr	Asn	Asp	Gly	Ser	tRNA	RNA
<b>m<sup>5</sup>C</b>	3,20	1,29	<0,1	3,99	3,85	1,41	34,61	3,07
	3,66	1,44	<0,1	4,59	4,32	1,54	39,45	3,19
<b>Gm</b>	0,14				0,18	0,67	3,70	4,02
	0,15				0,19	0,70	3,42	3,71
<b>m<sup>1</sup>A</b>	0,74	0,78	0,81	0,75	0,38	0,77	13,12	1,20
	0,77	0,84	0,85	0,78	0,42	0,78	13,73	1,25
<b>m<sup>1</sup>G</b>	1,20	1,48	1,46		<0,1	0,58	13,59	1,17
	1,14	1,46	1,36		0,12	0,57	12,74	1,04
<b>m<sup>22</sup>G</b>	<0,1	2,32	1,03		0,22	1,20	8,34	0,71
	0,10	3,02	1,27		0,25	1,40	9,59	0,81
<b>m<sup>2</sup>G</b>	1,03	2,41	1,45	1,12	1,05	1,05	22,48	2,01
	1,02	2,40	1,48	1,11	1,01	1,04	21,92	2,00
<b>m<sup>5</sup>U</b>	0,28	1,17	<0,1	0,89	0,69	1,04	8,25	0,62
	0,35	1,40	<0,1	1,00	0,77	1,19	8,72	0,71
<b>m<sup>6</sup>A</b>	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,63	0,22
	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,62	0,22
<b>m<sup>7</sup>G</b>	<0,1	0,91	0,87		0,19		8,76	0,67
	<0,1	0,79	0,73		0,18		7,74	0,57
<b>t<sup>6</sup>A</b>			0,94				3,28	0,27
			0,84				2,92	0,24
<b>acp<sup>3</sup>U</b>	<0,1	2,15	2,25		0,19		1,93	0,16
	0,11	2,30	2,36		0,23		2,01	0,17
<b>Y</b>	2,63	1,83	2,52	1,59	1,47	2,74	45,54	13,12
	2,61	1,35	2,06	1,45	1,25	2,43	43,75	11,25



**Abbildung S2: Auswirkung von NAIL-MS auf das Modifikationsprofil von tRNA und Gesamt-RNA** Zellen wurden in unmarkiertem und isopenmarkiertem Medium kultiviert und während der RNA Extraktion vereinigt und anschließend auf das Modifikationsprofil untersucht. Auf der x-Achse ist jeweils die gemessene Anzahl an ausgewiesener Modifikation in unmarkierten Zellen aufgetragen. Auf der y-Achse ist die entsprechende Menge isopenmarkierter Modifikation aufgetragen. Die gestrichelte Linie stellt eine Diagonale dar. Modifikationen, welche sich auf dieser befinden, zeigen keine Änderung der Abundanz abhängig vom gewählten Medium.



**Abbildung S3: Dynamik weiterer modifizierter Nukleoside in 28S rRNA.** Ursprüngliche Nukleoside (original, schwarze Linie) existierten vor Beginn des Experiments. Post-methylierte Nukleoside (methyl, dunkelgraue Linie) sind Modifikationen, die durch die Methylierung der ursprünglichen RNA nach dem Start des Experiments entstanden sind. Neue Nukleoside (neu, hellgraue Linie) zeigen den Einbau der Modifikation in neue Transkripte. Die Datenpunkte geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von  $n = 3$  biologischen Replikaten wieder.

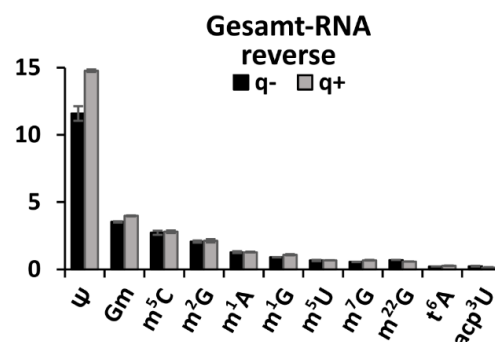
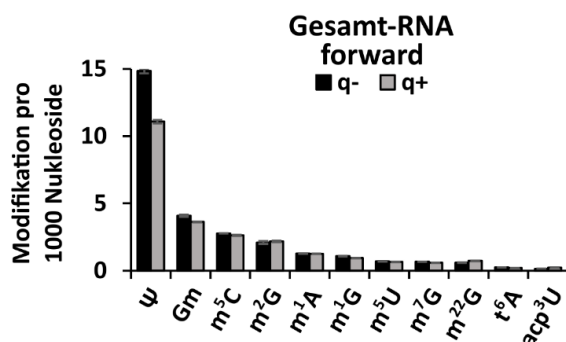
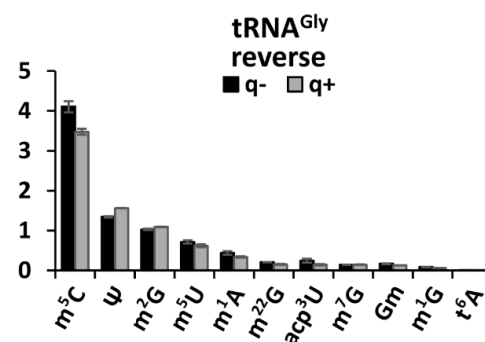
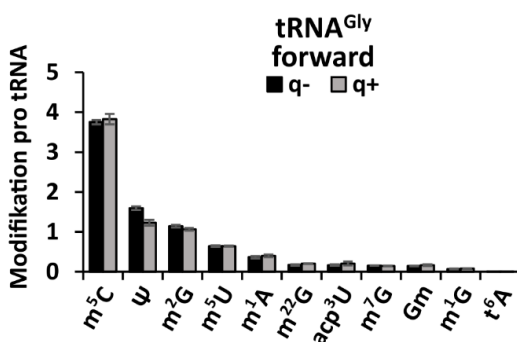
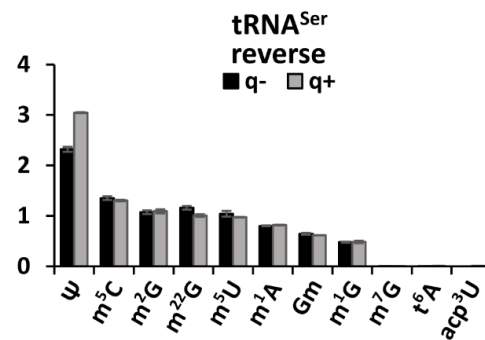
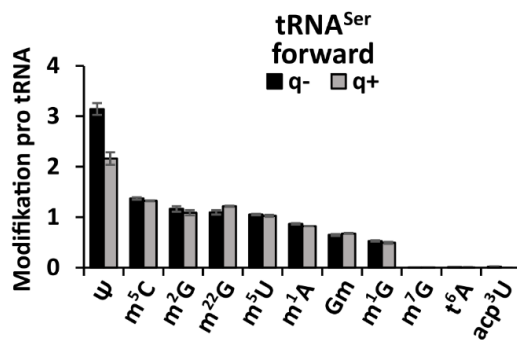
## 6.1 Zusätzliche Daten

**Tabelle S3: Modifikationsmengen in verschiedenen Standard-Medien.** Zellen wurden in Standard-DMEM D6546 mit nicht dialysiertem (nd) oder dialysiertem (dia) FBS kultiviert. Beide Varianten wurden je einmal ohne zusätzliche Supplementierung von Queuin kultiviert (nd- und dia-) und einmal mit 50 nM Queuin (nd+ und dia+). RNA wurde nach Kultivierung über 10 Tage isoliert, die jeweiligen tRNA-Isoakzeptoren aufgereinigt und über Nukleosid-QQQ analysiert. Modifikationsmengen wurden auf die Menge des jeweilig injizierten tRNA-Isoakzeptors normalisiert. Für jede Modifikation ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten angegeben. Zur besseren Übersicht wurden alle Werte > 0,05 hellgrün eingefärbt, alle Werte > 0,2 mit grün und Werte > 0,5 dunkelgrün. Für jegliche Modifikationen welche einen Zahlenwert aufweisen, konnten Signale integriert werden. Lediglich Modifikationen welche in der Tabelle weiße Bereiche aufweisen konnten nicht detektiert werden.

		Gm		Y		I		t <sup>6</sup> A		acp <sup>3</sup> U		m <sup>3</sup> C		ac <sup>4</sup> C		Cm	
		AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
His	nd-	0,25	0,02	2,86	0,44	0,07	0,04			0,19	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	nd+	0,19	0,00	3,14	0,14	0,30	0,33			0,16	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	dia-	0,25	0,00	2,73	0,20	0,07	0,01			0,18	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	dia+	0,18	0,01	2,97	0,50	0,05	0,01			0,14	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Tyr	nd-	0,10	0,00	2,11	0,04	0,04	0,00			2,90	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	nd+	0,01	0,01	1,83	0,04	0,04	0,01			2,92	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
	dia-	0,11	0,00	2,22	0,18	0,06	0,01			3,10	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	dia+	0,01	0,00	1,90	0,28	0,07	0,01			3,03	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Asn	nd-	0,00	0,00	2,75	0,04	0,03	0,00	0,99	0,00	3,66	0,18	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	nd+	0,01	0,01	2,83	0,14	0,07	0,03	1,00	0,01	3,59	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	dia-	0,00	0,00	1,60	0,19	0,04	0,01	0,71	0,07	3,74	0,38	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	dia+	0,01	0,00	1,86	0,15	0,05	0,01	0,86	0,05	3,93	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Asp	nd-	0,00	0,00	1,19	0,05	0,03	0,01			0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	nd+	0,01	0,01	1,43	0,22	0,04	0,03			0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	dia-	0,01	0,00	1,42	0,17	0,03	0,00			0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	dia+	0,01	0,00	1,17	0,04	0,05	0,03			0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ser	nd-	0,77	0,03	2,92	0,20	0,67	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	1,32	0,03	1,18	0,03	0,02	0,00
	nd+	0,77	0,01	2,83	0,06	0,67	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	1,30	0,02	1,16	0,03	0,02	0,00
	dia-	0,79	0,01	3,08	0,08	0,68	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	1,36	0,02	1,21	0,00	0,03	0,00
	dia+	0,77	0,00	2,98	0,09	0,67	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	1,33	0,01	1,21	0,00	0,03	0,00
Gly	nd-	0,25	0,00	1,22	0,03	0,04	0,00	0,00	0,00	0,80	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	nd+	0,25	0,01	1,24	0,03	0,04	0,01	0,00	0,00	0,88	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	dia-	0,24	0,00	1,23	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00	0,79	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	dia+	0,24	0,01	1,22	0,02	0,04	0,01	0,00	0,00	0,81	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
		m <sup>1</sup> A		m <sup>1</sup> G		m <sup>2</sup> G		m <sup>22</sup> G		m <sup>5</sup> C		m <sup>5</sup> U		m <sup>7</sup> G		Um	
		AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
His	nd-	1,08	0,00	1,44	0,03	1,17	0,01	0,06	0,01	3,18	0,04	0,35	0,01	0,06	0,01	0,11	0,01
	nd+	1,10	0,03	1,48	0,02	1,18	0,03	0,05	0,00	3,12	0,07	0,31	0,02	0,04	0,00	0,08	0,02
	dia-	1,03	0,04	1,37	0,05	1,11	0,02	0,06	0,01	3,08	0,07	0,30	0,02	0,05	0,01	0,08	0,01
	dia+	1,03	0,06	1,41	0,10	1,19	0,11	0,05	0,01	2,95	0,13	0,27	0,01	0,04	0,01	0,08	0,02
Tyr	nd-	1,10	0,02	1,59	0,03	3,00	0,05	2,49	0,05	1,30	0,03	1,33	0,03	0,84	0,02	0,00	0,00
	nd+	1,09	0,06	1,56	0,10	2,94	0,20	2,45	0,17	1,28	0,09	1,27	0,09	0,83	0,06	0,01	0,01
	dia-	1,06	0,01	1,53	0,02	2,86	0,05	2,39	0,03	1,27	0,01	1,26	0,08	0,81	0,03	0,01	0,01
	dia+	1,10	0,01	1,61	0,01	2,94	0,11	2,50	0,02	1,30	0,00	1,28	0,04	0,83	0,00	0,01	0,01
Asn	nd-	1,13	0,01	1,55	0,01	1,88	0,03	1,13	0,02	0,04	0,01	0,07	0,00	0,85	0,02	0,11	0,00
	nd+	1,16	0,00	1,61	0,01	1,88	0,01	1,16	0,01	0,04	0,00	0,07	0,00	0,86	0,01	0,15	0,01
	dia-	0,82	0,07	1,13	0,11	1,38	0,14	0,83	0,08	0,04	0,00	0,05	0,00	0,83	0,13	0,11	0,01
	dia+	0,98	0,05	1,36	0,07	1,57	0,08	0,99	0,05	0,04	0,00	0,06	0,01	0,80	0,01	0,13	0,01
Asp	nd-	0,96	0,04	0,02	0,02	1,14	0,04	0,00	0,00	3,35	0,11	1,03	0,04	0,02	0,01	0,11	0,01
	nd+	0,99	0,04	0,03	0,00	1,21	0,06	0,00	0,00	3,65	0,15	1,08	0,06	0,01	0,00	0,10	0,01
	dia-	0,93	0,01	0,04	0,00	1,19	0,04	0,00	0,00	3,25	0,03	1,05	0,01	0,01	0,00	0,12	0,00
	dia+	0,90	0,01	0,04	0,00	1,18	0,01	0,00	0,00	3,52	0,03	1,13	0,20	0,00	0,00	0,11	0,01
Ser	nd-	1,28	0,02	0,92	0,02	1,50	0,04	1,52	0,04	1,66	0,03	1,52	0,12	0,00	0,00	0,96	0,01
	nd+	1,25	0,04	0,87	0,03	1,48	0,04	1,49	0,03	1,63	0,03	1,44	0,06	0,00	0,00	0,95	0,06
	dia-	1,30	0,00	0,92	0,01	1,59	0,07	1,55	0,01	1,70	0,02	1,48	0,04	0,01	0,00	0,95	0,09
	dia+	1,29	0,00	0,94	0,00	1,56	0,07	1,54	0,00	1,70	0,02	1,52	0,02	0,01	0,00	0,91	0,05
Gly	nd-	0,72	0,01	0,10	0,00	1,20	0,01	0,29	0,01	3,71	0,01	0,90	0,01	0,23	0,01	0,60	0,04
	nd+	0,72	0,01	0,10	0,00	1,20	0,00	0,29	0,01	3,71	0,06	0,92	0,02	0,24	0,01	0,63	0,02
	dia-	0,69	0,00	0,10	0,00	1,16	0,00	0,28	0,00	3,71	0,01	0,90	0,00	0,23	0,00	0,67	0,03
	dia+	0,66	0,00	0,10	0,00	1,14	0,01	0,28	0,01	3,64	0,03	0,88	0,06	0,23	0,00	0,69	0,07

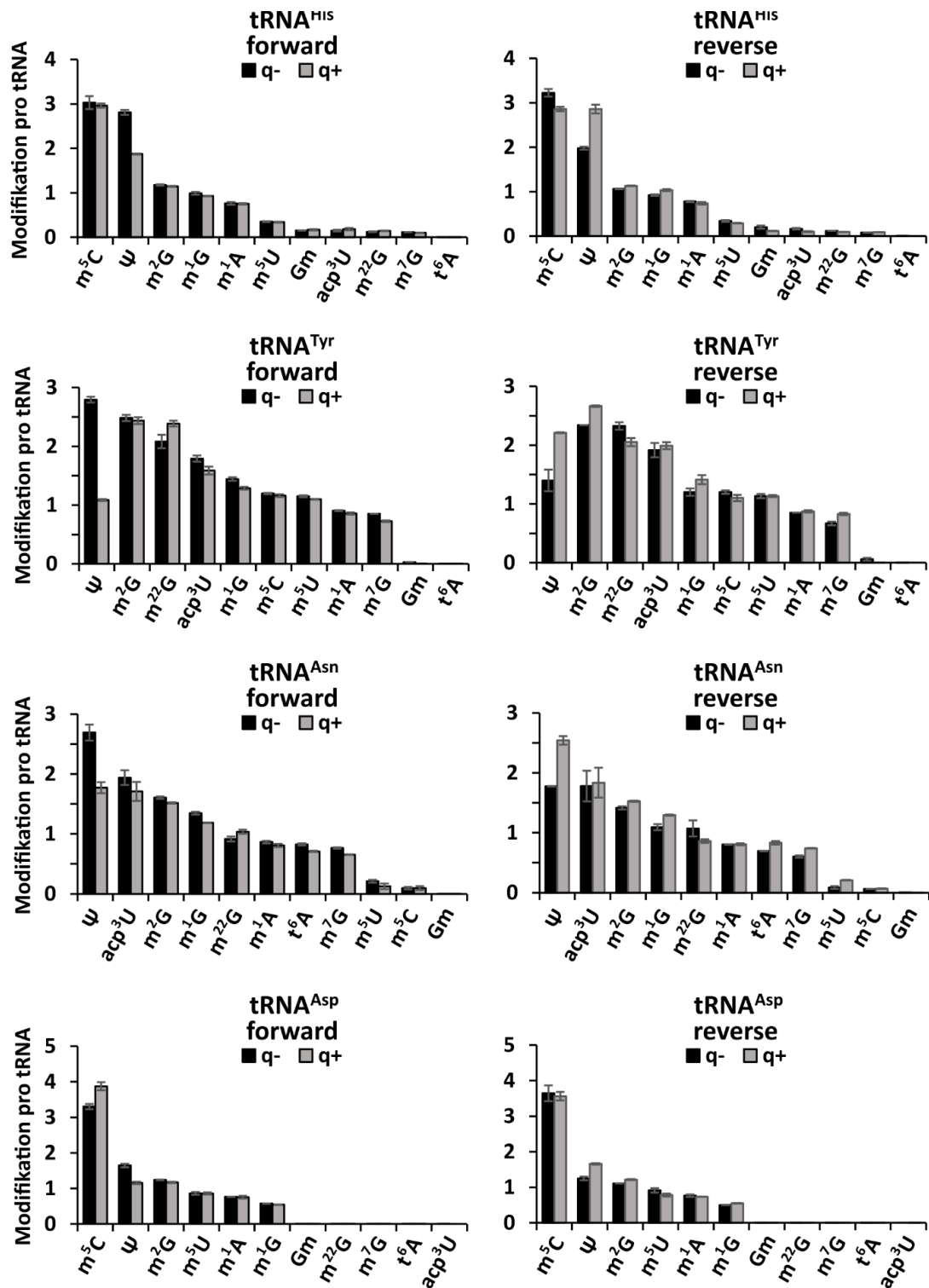
Fortsetzung Tabelle S3:

		m <sup>1</sup> I		m <sup>3</sup> U		mcm <sup>5</sup> U		ncm <sup>5</sup> U		m <sup>6</sup> A		i <sup>6</sup> A		mcm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U		Am	
		AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
His	nd-	0,06	0,01					0,04	0,00	0,06	0,00					0,01	0,00
	nd+	0,05	0,00					0,04	0,00	0,07	0,00					0,01	0,00
	dia-	0,06	0,01					0,04	0,01	0,07	0,00					0,01	0,00
	dia+	0,05	0,00					0,03	0,00	0,07	0,00					0,01	0,01
Tyr	nd-	0,00	0,00					0,00	0,00	0,07	0,00					0,01	0,01
	nd+	0,00	0,00					0,00	0,00	0,07	0,00						
	dia-	0,00	0,00					0,00	0,00	0,07	0,00						
	dia+	0,00	0,00					0,00	0,00	0,07	0,00						
Asn	nd-	0,00	0,00					0,00	0,00	0,07	0,00						
	nd+	0,00	0,00					0,00	0,00	0,07	0,00						
	dia-	0,00	0,00					0,00	0,00	0,06	0,01						
	dia+	0,00	0,00					0,00	0,00	0,06	0,00					0,00	0,01
Asp	nd-	0,00	0,00					0,00	0,00	0,08	0,00						
	nd+	0,00	0,00					0,00	0,00	0,08	0,00					0,00	0,01
	dia-	0,01	0,00					0,00	0,00	0,10	0,00						
	dia+	0,01	0,00					0,00	0,00	0,09	0,00						
Ser	nd-	0,00	0,00	0,42	0,02			0,28	0,02	0,08	0,00	0,09	0,00			0,01	0,00
	nd+	0,00	0,00	0,34	0,02			0,31	0,01	0,09	0,00	0,08	0,00			0,01	0,00
	dia-	0,00	0,00	0,35	0,03			0,28	0,00	0,09	0,00	0,10	0,01			0,01	0,00
	dia+	0,00	0,00	0,36	0,01			0,32	0,00	0,09	0,00	0,09	0,00			0,01	0,00
Gly	nd-	0,26	0,01			0,22	0,01	0,18	0,00	0,06	0,00			0,01	0,00	0,00	0,00
	nd+	0,26	0,01			0,23	0,02	0,19	0,01	0,06	0,00			0,01	0,00	0,00	0,00
	dia-	0,24	0,00			0,17	0,02	0,17	0,01	0,06	0,00			0,01	0,00	0,00	0,00
	dia+	0,25	0,00			0,20	0,02	0,19	0,01	0,05	0,00			0,01	0,00	0,00	0,00

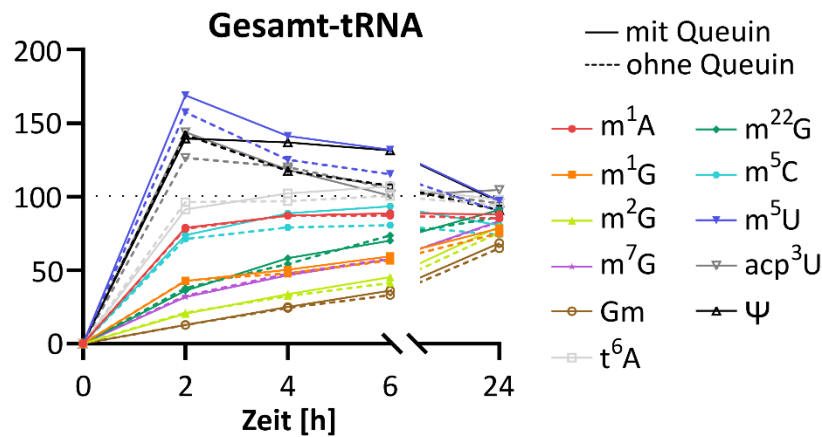




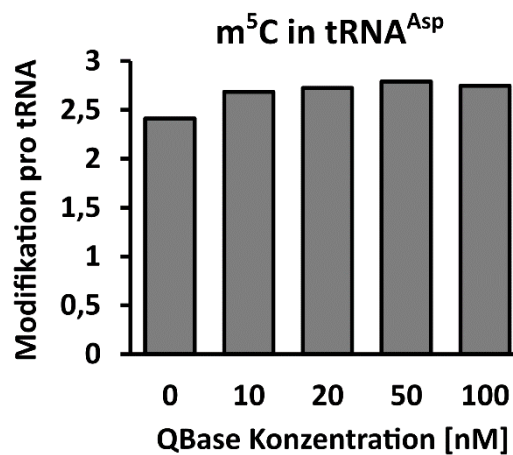
## 6.1 Zusätzliche Daten



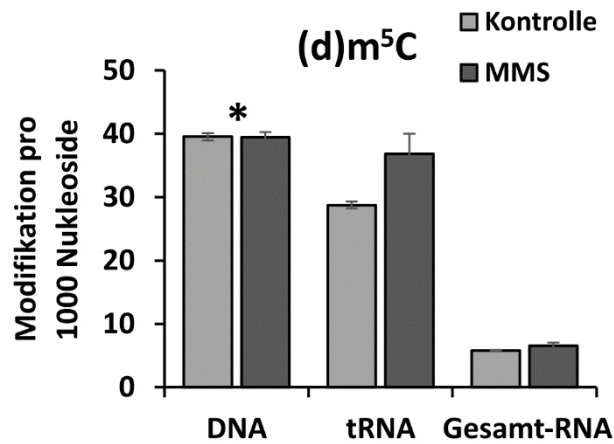
**Abbildung S4: NAIL-MS Daten des Einflusses von Q auf tRNA-Isoakzeptoren.** Im forward-Experiment wurden Zellen aus isotopenmarkiertem und Queuine supplementiertem (q+) Medium vor RNA Extraktion mit Zellen aus unmarkiertem Medium ohne Queuine (q-) vereinigt und prozessiert. Im reverse-Experiment wurden die Zellen umgekehrt markiert. Absolute Werte der Modifikationsmengen sind jeweils für q+ und q- angegeben. Die Balken geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von n = 3 biologischen Replikaten wieder.



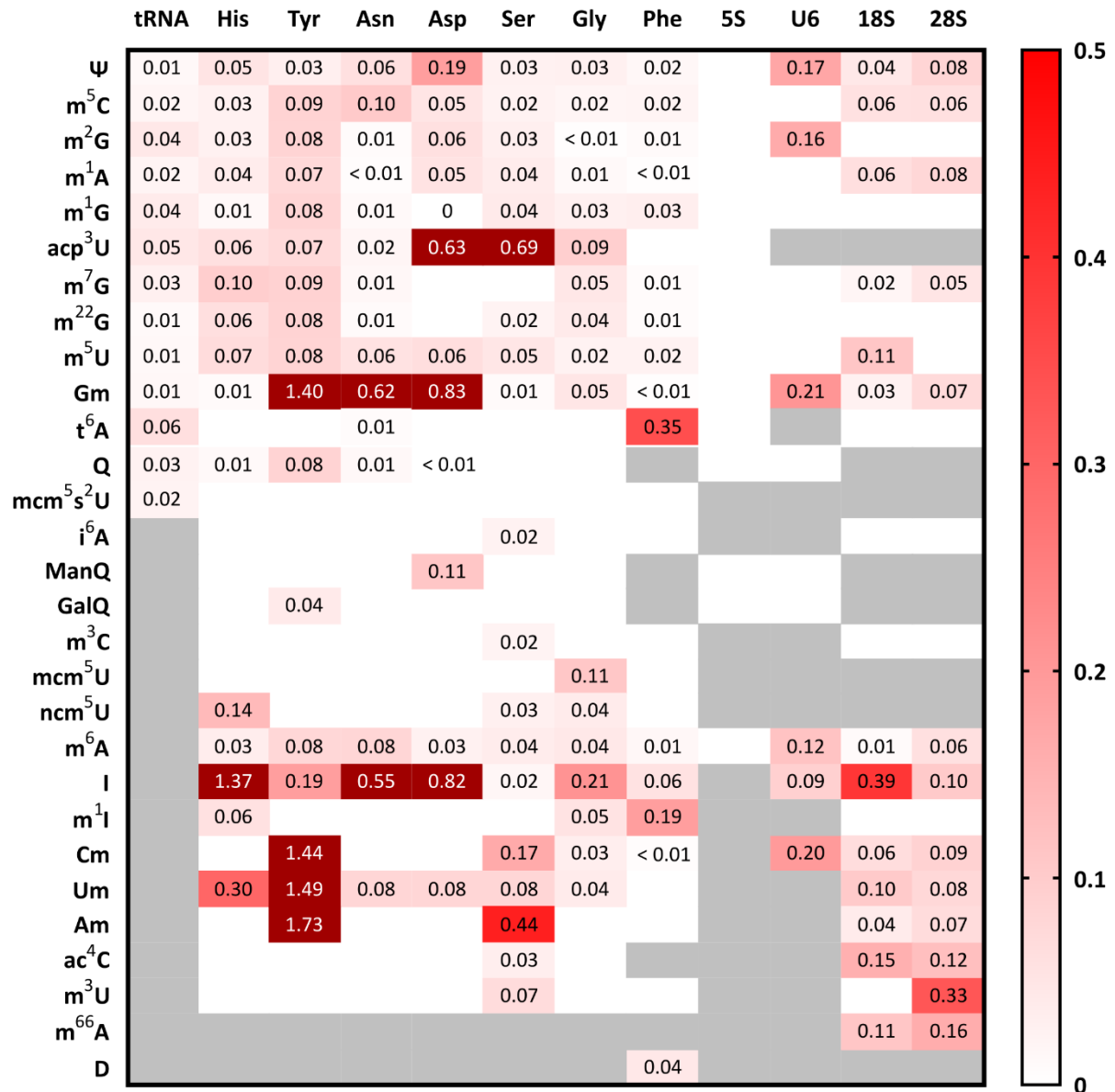
**Abbildung S5: Auswirkung von Queuin auf tRNA-Isoakzeptor-Reifung.** Absolute Mengen an Modifikation pro 1000 Nukleoside wurden auf die jeweilige Menge bei Zeitpunkt 0 unter Queuin Supplementierung referenziert. Durchgezogene Linien zeigen das Level in Zellen unter Queuin Supplementierung während gestrichelte Linien das Level in Zellen ohne Queuin zeigen. Jede Farbe & Symbol repräsentiert eine Modifikation.



**Abbildung S6:  $m^5C$  in  $tRNA^{Asp}$  bei Konzentrationsoptimierung von Queuin.** Zellen wurden in Standard-Medium (DMEM D6546) mit dialysiertem FBS und aufsteigenden Konzentrationen an Queuin kultiviert. Die absolute Modifikationsmenge von  $m^5C$  in  $tRNA^{Asp}$  wurde über Nukleosid-MS bestimmt. Werte geben die durchschnittliche Anzahl an  $m^5C$  pro tRNA-Molekül an.



**Abbildung S7: Menge an (d)m<sup>5</sup>C nach MMS Stress in DNA, tRNA und Gesamt-RNA.** Zellen wurden mit 1 mM MMS gestresst. Nach Extraktion der DNA und RNA wurden die Modifikationsmengen mit einer Kontrolle verglichen. dm<sup>5</sup>C aus DNA konnte aufgrund fehlenden Standards nicht quantitativ ausgewertet werden. \*Die Werte für dm<sup>5</sup>C in DNA wurden daher durch 150 dividiert, um die Ergebnisse mit tRNA und Gesamt-RNA zu plotten. Die Balken geben den Mittelwert und die Standardabweichungen von n = 3 biologischen Replikaten wieder.



**Abbildung S8: Relative Standardabweichung der Modifikationsmengen in aufgereinigten RNA-Molekülen.** Angezeigte RNA-Moleküle wurden über Größenausschlusschromatographie und gegebenenfalls Oligonukleotid-Hybridisierung aufgereinigt, zu Nukleosiden verdaut und über Nukleosid-MS analysiert. Angegeben ist die relative Standardabweichung der Modifikationsmenge pro RNA-Molekül (für Gesamt-tRNA pro 60 kanonische Nukleoside). Weiße Felder ohne Zahl stehen für Modifikationen welche zwar analysiert aber < 0,01 Modifikationen pro RNA Molekül aufwiesen. Grau hinterlegte Modifikationen wurden dagegen nicht analysiert. Die Mengen für 5S rRNA und U6 snRNA wurden aus vergleichenden NAIL-MS Experimenten ermittelt. Hier können Ungenauigkeiten aufgrund der Isotopenmarkierung nicht ausgeschlossen werden. Alle Zellen wurden in Standard-Medium unter Supplementierung von 50 nM Queuin kultiviert. Werte geben die relative Standardabweichung aus n = 3 biologischen Replikaten wieder.

**Tabelle S4: Optimierte Parameter für RNA-Nukleosid DMRM-Methode.**

Compound Gruppe	Compound Name	Vorläufer Ion	Produkt Ion	R <sub>t</sub> (min)	ΔR <sub>t</sub> (min)	Frag-mentor	Kollisions Energy
A	A	268,1	136,0	5,3	1	200	20
A	A lab	273,0	141,0	5,3	1	200	20
A SILIS	A SILIS	283,0	146,0	5,3	1	200	20
ac4C	ac4C	286,1	154,0	5	1	85	9
ac4C	ac4C lab	293,0	156,0	5	1	85	9
ac4C SILIS	ac4C SILIS	300,0	163,0	5	1	85	9
acp3U	acp3U	346,1	214,1	2,3	1	95	15
acp3U	acp3U lab	353,1	216,1	2,3	1	95	15
Am	Am	282,1	136,0	6	1	130	17
Am	Am D3	285,0	136,0	6	1	130	17
Am	Am lab	287,0	141,0	6	1	130	17
Am	Am lab D3	290,0	141,0	6	1	130	17
Am SILIS	Am SILIS	298,0	146,0	6	1	130	17
C	C	244,1	112,0	2,1	1	200	20
C	C lab	251,0	114,0	2,1	1	200	20
C SILIS	C SILIS	256,0	119,0	2,1	1	200	20
Cm	Cm	258,1	112,0	4,1	1	180	9
Cm	Cm D3	261,0	112,0	4,1	1	180	9
Cm	Cm lab	265,0	114,0	4,1	1	180	9
Cm	Cm lab D3	268,0	114,0	4,1	1	180	9
Cm SILIS	Cm SILIS	271,0	119,0	4,1	1	180	9
D	D	247,1	115,0	1,6	1	70	5
D	D lab	254,0	117,0	1,6	1	70	5
D SILIS	D SILIS	258,0	121,0	1,6	1	70	5
G	G	284,1	152,0	4,3	1	200	20
G	G lab	288,0	156,0	4,3	1	200	20
G SILIS	G SILIS	299,0	162,0	4,3	1	200	20
Gm	Gm	298,1	152,0	5	1	100	9
Gm	Gm D3	301,0	152,0	5	1	100	9
Gm	Gm lab	302,0	156,0	5	1	100	9
Gm	Gm lab D3	305,0	156,0	5	1	100	9
Gm SILIS	Gm SILIS	314,0	162,0	5	1	100	9
I	I	269,1	137,0	4,1	1	100	10
I	I lab	273,0	141,0	4,1	1	100	10
I SILIS	I SILIS	283,0	146,0	4,1	1	100	10
i6A	i6A	336,3	204,1	8	1	140	17
i6A	i6A lab	341,3	209,1	8	1	140	17
i6A SILIS	i6A SILIS	356,0	219,0	8	1	140	17
m1A	m1A	282,1	150,0	2,2	1,5	150	25
m1A	m1A D3	285,0	153,0	2,2	1,5	150	25
m1A	m1A lab	287,0	155,0	2,2	1,5	150	25
m1A	m1A lab D3	290,0	158,0	2,2	1,5	150	25
m1A SILIS	m1A SILIS	298,0	161,0	2,2	1,5	150	25

Compound Gruppe	Compound Name	Vorläufer Ion	Produkt Ion	R <sub>t</sub> (min)	ΔR <sub>t</sub> (min)	Frag-mentor	Kollisions Energy
m1G	m1G	298,1	166,0	4,9	1	105	13
m1G	m1G D3	301,0	169,0	4,9	1	105	13
m1G	m1G lab	302,0	170,0	4,9	1	105	13
m1G	m1G lab D3	305,0	173,0	4,9	1	105	13
m1G SILIS	m1G SILIS	314,0	177,0	4,9	1	105	13
m1I	m1I	283,1	151,0	4,8	1	80	12
m1I	m1I D3	286,1	154,0	4,8	1	80	12
m1I	m1I lab	287,1	155,0	4,8	1	80	12
m1I	m1I lab D3	290,1	158,0	4,8	1	80	12
m1I SILIS	m1I SILIS	298,0	161,0	4,8	1	80	12
m22G	m22G	312,1	180,0	5,7	1	105	13
m22G	m22G D3	318,0	186,0	5,7	1	105	13
m22G	m22G lab	316,0	184,0	5,7	1	105	13
m22G	m22G lab D3	322,0	190,0	5,7	1	105	13
m22G SILIS	m22G SILIS	329,0	192,0	5,7	1	105	13
m2G	m2G	298,1	166,0	5,1	1	95	17
m2G	m2G D3	301,0	169,0	5,1	1	95	17
m2G	m2G lab	302,0	170,0	5,1	1	95	17
m2G	m2G lab D3	305,0	173,0	5,1	1	95	17
m2G SILIS	m2G SILIS	314,0	177,0	5,1	1	95	17
m3C	m3C	258,1	126,0	2	1,5	88	14
m3C	m3C D3	261,0	129,0	2	1,5	88	14
m3C	m3C lab	265,0	128,0	2	1,5	88	14
m3C	m3C lab D3	268,0	131,0	2	1,5	88	14
m3C SILIS	m3C SILIS	271,0	134,0	2	1,5	88	14
m3U	m3U	259,1	127,0	4,8	0,6	75	9
m3U	m3U D3	262,0	130,0	4,8	0,6	75	9
m3U	m3U lab	266,0	129,0	4,8	0,6	75	9
m3U	m3U lab D3	269,0	132,0	4,8	0,6	75	9
m5C	m5C	258,1	126,0	3,8	1	185	13
m5C	m5C D3	261,0	129,0	3,8	1	185	13
m5C	m5C lab	265,0	128,0	3,8	1	185	13
m5C	m5C lab D3	268,0	131,0	3,8	1	185	13
m5C SILIS	m5C SILIS	271,0	134,0	3,8	1	185	13
m5U	m5U	259,1	127,0	4,4	1	95	9
m5U	m5U D3	262,0	130,0	4,4	1	95	9
m5U	m5U lab	266,0	129,0	4,4	1	95	9
m5U	m5U lab D3	269,0	132,0	4,4	1	95	9
m5U SILIS	m5U SILIS	271,0	134,0	4,4	1	95	9
m66A	m66A	296,0	164,0	7,1	1	130	21
m66A	m66A D3	302,0	170,0	7,1	1	130	21
m66A	m66A lab	301,0	169,0	7,1	1	130	21
m66A	m66A lab D3	307,0	175,0	7,1	1	130	21
m66A SILIS	m66A SILIS	313,0	176,0	7,1	1	130	21

## 6.1 Zusätzliche Daten

Compound Gruppe	Compound Name	Vorläufer Ion	Produkt Ion	R <sub>t</sub> (min)	ΔR <sub>t</sub> (min)	Frag-mentor	Kollisions Energy
m6A	m6A	282,1	150,0	6,5	1	125	17
m6A	m6A D3	285,0	153,0	6,5	1	125	17
m6A	m6A lab	287,0	155,0	6,5	1	125	17
m6A	m6A lab D3	290,0	158,0	6,5	1	125	17
m6A SILIS	m6A SILIS	298,0	161,0	6,5	1	125	17
m7G	m7G	298,1	166,0	3,5	1,5	100	13
m7G	m7G D3	301,0	169,0	3,5	1,5	100	13
m7G	m7G lab	302,0	170,0	3,5	1,5	100	13
m7G	m7G lab D3	305,0	173,0	3,5	1,5	100	13
m7G SILIS	m7G SILIS	314,0	177,0	3,5	1,5	100	13
mcm5s2U	mcm5s2U	333,1	201,0	6,2	1	92	8
mcm5s2U	mcm5s2U D3	336,1	204,0	6,2	1	92	8
mcm5s2U	mcm5s2U lab	340,1	203,0	6,2	1	92	8
mcm5s2U	mcm5s2U lab D3	343,1	206,0	6,2	1	92	8
mcm5s2U SILIS	mcm5s2U SILIS	347,1	210,0	6,2	1	92	8
mcm5U	mcm5U	317,1	185,1	5	1	95	5
mcm5U	mcm5U D3	320,1	188,1	5	1	95	5
mcm5U	mcm5U lab	324,1	187,1	5	1	95	5
mcm5U	mcm5U lab D3	327,1	190,1	5	1	95	5
mcm5U SILIS	mcm5U SILIS	331,0	194,0	5	1	95	5
ncm5U	ncm5U	302,0	170,0	2,5	1	85	8
ncm5U	ncm5U lab	309,0	172,0	2,5	1	85	8
ncm5U SILIS	ncm5U SILIS	316,0	179,0	2,5	1	85	8
Q	Q	410,2	295,1	4,3	1	115	12
t6A	t6A	413,1	281,1	5,8	1	130	9
t6A	t6A lab	418,1	286,1	5,8	1	130	9
t6A SILIS	t6A SILIS	434,0	297,0	5,8	1	130	9
U	U	245,1	113,0	3	1	95	5
U	U lab	252,0	115,0	3	1	95	5
U SILIS	U SILIS	256,0	119,0	3	1	95	5
Um	Um	259,2	113,0	4,6	1	96	8
Um	Um D3	262,2	113,0	4,6	1	96	8
Um	Um lab	266,2	115,0	4,6	1	96	8
Um	Um lab D3	269,2	115,0	4,6	1	96	8
Um SILIS	Um SILIS	271,1	119,0	4,6	1	96	8
Y	Y	245,1	209,0	1,7	1	90	5
Y	Y lab	252,0	216,0	1,7	1	90	5
Y SILIS	Y SILIS	256,0	220,0	1,7	1	90	5
ManQ	ManQ	572,3	295,5	3,9	1	120	20
GalQ	GalQ	572,3	295,5	4,1	1	120	20



**Tabelle S5: Optimierte Parameter für DNA-Nukleosid DMRM Methode.**

Compound Gruppe	Compound Name	Vorläufer Ion	Produkt Ion	R <sub>t</sub> (min)	ΔR <sub>t</sub> (min)	Frag-mentor	Kollisions Energy
dA	dA	252,1	136,3	5,7	1	90	14
dA	dA lab	257,1	141,3	5,7	1	90	14
dA SILIS	dA SILIS	267,1	146,3	5,7	1	90	14
dC	dC	228,1	112,0	3	1	160	12
dC	dC lab	235,1	114,0	3	1	160	12
dC SILIS	dC SILIS	240,1	119,0	3	1	160	12
dG	dG	268,1	152,3	4,8	1	120	9
dG	dG lab	272,1	156,3	4,8	1	120	9
dG SILIS	dG SILIS	283,1	162,1	4,8	1	120	9
dm1A	dm1A	266,1	150,3	2,6	2	90	14
dm1A	dm1A D3	269,1	153,3	2,6	2	90	14
dm1A	dm1A lab	271,1	155,3	2,6	2	90	14
dm1A	dm1A lab D3	274,1	158,3	2,6	2	90	14
dm1A SILIS	dm1A SILIS	282,1	161,3	2,6	2	90	14
dm3C	dm3C	242,1	126,3	2,7	1,5	80	12
dm3C	dm3C D3	245,1	129,3	2,7	1,5	80	12
dm3C	dm3C lab	249,1	128,3	2,7	1,5	80	12
dm3C	dm3C lab D3	252,1	131,3	2,7	1,5	80	12
dm3C SILIS	dm3C SILIS	254,1	133,3	2,7	1,5	80	12
dm5C	dm5C	242,1	126,3	3,4	1,5	80	12
dm5C	dm5C D3	245,1	129,3	3,4	1,5	80	12
dm5C	dm5C lab	249,1	128,3	3,4	1,5	80	12
dm5C	dm5C lab D3	252,1	131,3	3,4	1,5	80	12
dm5C SILIS	dm5C SILIS	254,1	133,3	3,4	1,5	80	12
dm6A	dm6A	266,1	150,3	6,7	1	100	14
dm6A	dm6A D3	269,1	153,3	6,7	1	100	14
dm6A	dm6A lab	271,1	155,3	6,7	1	100	14
dm6A	dm6A lab D3	274,1	158,3	6,7	1	100	14
dm6A SILIS	dm6A SILIS	282,1	161,3	6,7	1	100	14
dm7G	dm7G	282,1	166,3	3,5	1	80	15
dm7G	dm7G D3	285,1	169,3	3,5	1	80	15
dm7G	dm7G lab	286,1	170,3	3,5	1	80	15
dm7G	dm7G lab D3	289,1	173,3	3,5	1	80	15
dm7G SILIS	dm7G SILIS	298,1	177,0	3,5	1	80	15
dT	dT	243,1	127,3	5	1	80	8
dT	dT lab	250,1	129,3	5	1	80	8
dT	dT lab D3	253,1	132,3	5	1	80	8
dT SILIS	dT SILIS	255,1	134,3	5	1	80	8

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Aufbau von RNA.....	1
Abbildung 1.2:	Nomenklatur und Beispiele von RNA-Modifikationen. ....	4
Abbildung 1.3:	Struktur von tRNA.....	6
Abbildung 1.4:	Prozessierung von tRNA-Molekülen.....	9
Abbildung 1.5:	Modifikationen im T $\Psi$ C-Arm. ....	11
Abbildung 1.6:	m <sup>22</sup> G in tRNA.....	13
Abbildung 1.7:	Positionen häufig modifizierter Nukleoside in der Anticodon-Schleife. ....	15
Abbildung 1.8:	Biosynthese von Queuosin in Prokaryoten.....	17
Abbildung 1.9:	Queuin (A) und in Eukaryoten vertretene Queuosin-Derivate (B).....	19
Abbildung 1.10:	Modifikationen im Anticodon von tRNA <sup>Tyr</sup> <sub>GUA</sub> und deren Auswirkung auf die Basenpaarung. ....	22
Abbildung 1.11:	Mechanismus von Eisen(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. ....	26
Abbildung 1.12:	Häufig in RNA auftretende Schäden durch alkylierende Agenzien...	28
Abbildung 1.13:	Allgemeine Funktionsweise eines LC-MS/MS-Systems.....	33
Abbildung 1.14:	Anwendungsgebiete von NAIL-MS.....	36
Abbildung 2.1:	Zielsetzungen der Arbeit. ....	38
Abbildung 3.1:	Isotopenmarkierung von Uridin und Adenin.....	93
Abbildung 3.2:	Vorgehensweise zur vollständigen Isotopenmarkierung aller Nukleoside in RNA-Molekülen.....	94
Abbildung 3.3:	Sequenz des zu analysierenden Oligonukleotids aus 18S rRNA.....	95
Abbildung 3.4:	HRMS nach RNase T1 Verdau von 18S rRNA. ....	97
Abbildung 3.5:	Northern Blot Analyse unmarkierter und isotopenmarkierter tRNA-Isoakzeptoren. ....	99
Abbildung 3.6:	Hypothese (A) und Ergebnis (B) des Einflusses von Adenin und Uridin auf die tRNA-Transkriptionsrate. ....	101
Abbildung 3.7:	Auswirkung von NAIL-MS auf das Modifikationsprofil von tRNA-Isoakzeptoren. ....	106
Abbildung 3.8:	Zeitlicher Verlauf des Auf- und Abbaus von RNA-Molekülen.....	108
Abbildung 3.9:	Dynamik ausgewählter modifizierter Nukleoside in 28S rRNA.....	112
Abbildung 3.10:	Konzentrationsbestimmung der Queuine-Zufütterung.....	196
Abbildung 3.11:	Queuin-Konzentration in nicht dialysiertem FBS.....	197

Abbildung 3.12: Northern-Blot-Analyse der tRNA-Isoakzeptor-Abundanz in Abhängigkeit von Queuin.....	199
Abbildung 3.13: Änderung von Modifikationen, beim Fehlen von Queuin im Medium.....	201
Abbildung 3.14: NAIL-MS Daten des Einflusses von Queuin auf tRNA-Isoakzeptoren.....	206
Abbildung 3.15: Zufütterung und Entzug von Queuin.....	208
Abbildung 3.16: Auswirkung von Queuin auf tRNA-Isoakzeptor Reifung.....	212
Abbildung 3.17: Auswirkung von Queuin auf originale tRNA <sup>Asn</sup> .....	214
Abbildung 3.18: Konzentrationsbestimmung von Rhein in Zellkultur.....	223
Abbildung 3.19: Zeitlicher Verlauf der Modifikationsmenge bei Rhein-Zugabe.....	224
Abbildung 3.20: Zeitlicher Verlauf der Modifikationsmenge über NAIL-MS.....	225
Abbildung 3.21: Vergleich von MMS-Schäden in DNA und RNA.....	228
Abbildung 3.22: NAIL-MS „Pulse-Chase“-Experiment an DNA unter MMS-Stress. ...	230
Abbildung 3.23: Modifikationsdynamik über Passagenanzahl.....	232
Abbildung 3.24: Modifikationsdynamik über Passagendauer.....	234
Abbildung 3.25: Dynamik von Q in Standard-Medium.....	235
Abbildung 3.26: Modifikationsmenge in aufgereinigten RNA-Molekülen.....	237
Abbildung 4.1: Zusammenfassung der Arbeit.....	241
Abbildung S1: Biosynthese von Nukleosiden.....	ii
Abbildung S2: Auswirkung von NAIL-MS auf das Modifikationsprofil von tRNA und Gesamt-RNA.....	iii
Abbildung S3: Dynamik weiterer modifizierter Nukleoside in 28S rRNA.....	iii
Abbildung S4: NAIL-MS Daten des Einflusses von Q auf tRNA-Isoakzeptoren.....	vi
Abbildung S5: Auswirkung von Queuin auf tRNA-Isoakzeptor-Reifung.....	vii
Abbildung S6: m <sup>5</sup> C in tRNA <sup>Asp</sup> bei Konzentrationsoptimierung von Queuin.....	vii
Abbildung S7: Menge an (d)m <sup>5</sup> C nach MMS Stress in DNA, tRNA und Gesamt-RNA.....	viii
Abbildung S8: Relative Standardabweichung der Modifikationsmengen in aufgereinigten RNA-Molekülen.....	ix

## 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Korrelationen von tRNA-Modifikationen und Krankheiten. ....	29
Tabelle 3.1:	Anteil an quantifizierten Modifikationen im MBN-Verdau und 18S rRNA. ....	96
Tabelle 3.2:	Abundanz der tRNA-Isoakzeptoren in isotopenmarkierten Zellen. ....	104
Tabelle 3.3:	Absolute Mengen an m <sup>5</sup> U in den tRNA-Isoakzeptoren über Zeit. ..	211
Tabelle 3.4	Unterschiede im Reifungsprozess von tRNA-Molekülen in Abhängigkeit von Queuin. ....	216
Tabelle 5.1:	Geräteliste .....	244
Tabelle 5.2:	Herstellung der Stocklösungen für die Verwendung in Zellkultur. .	245
Tabelle 5.3:	Oligonukleotide für die RNA-Aufreinigung.....	251
Tabelle 5.4:	Beispielhafter Master-Mix für den Verdau von RNA.....	253
Tabelle 5.5:	Oligonukleotide für Northern-Blotting. ....	255
Tabelle S1:	Kürzel aller gängigen funktionalen Gruppen in RNA- Modifikationen. ....	i
Tabelle S2:	Modifikationsprofil in unmarkierten und isotopenmarkierten Isoakzeptoren. ....	ii
Tabelle S3:	Modifikationsmengen in verschiedenen Standard-Medien. ....	iv
Tabelle S4:	Optimierte Parameter für RNA-Nukleosid DMRM-Methode.....	x
Tabelle S5:	Optimierte Parameter für DNA-Nukleosid DMRM Methode.....	xiii

## 7. Referenzen

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **1953**, 171 (4356), 737. PMID 13054692.
- [2] F. Crick: Central dogma of molecular biology. *Nature*, **1970**, 227 (5258), 561. PMID 4913914.
- [3] S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson: An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, **1961**, 190, 576. PMID 20446365.
- [4] F. Gros, H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risebroughl, *et al.*: Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Escherichia coli*. *Nature*, **1961**, 190, 581. PMID 13708983.
- [5] M. B. Hoagland, M. L. Stepehnson, J. F. Scott, L. I. Hecht, P. C. Zamecnik: A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *The Journal of biological chemistry*, **1958**, 231 (1), 241. PMID 13538965.
- [6] F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, *et al.*: On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1962**, 48, 1086. PMID 13878159.
- [7] D. Grunberger, I. B. Weinstein, K. B. Jacobson: Codon recognition by enzymatically mischarged valine transfer ribonucleic acid. *Science (New York, N.Y.)*, **1969**, 166 (3913), 1635. PMID 4902680.
- [8] A. Rich, U. L. RajBhandary: Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annual review of biochemistry*, **1976**, 45, 805. PMID 60910.
- [9] P. Schimmel: The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **2018**, 19 (1), 45. PMID 28875994.
- [10] P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piatkowski, B. Baginski, *et al.*: MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic acids research*, **2018**, 46 (D1), D303-D307. PMID 29106616.
- [11] S. M. Lyons, M. M. Fay, P. Ivanov: The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. *FEBS letters*, **2018**, 592 (17), 2828. PMID 30058219.
- [12] C. Lorenz, C. E. Lünse, M. Mörl: tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation. *Biomolecules*, **2017**, 7 (2). PMID 28375166.
- [13] H. Grosjean, D. G. Söll, D. M. Crothers: Studies of the complex between transfer RNAs with complementary anticodons. I. Origins of enhanced affinity between complementary triplets. *Journal of molecular biology*, **1976**, 103 (3), 499. PMID 781277.
- [14] A. L. Konevega, N. G. Soboleva, V. I. Makhno, Y. P. Semenov, W. Wintermeyer, *et al.*: Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon-anticodon interaction in the ribosomal A site by stacking and Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions. *RNA*, **2004**, 10 (1), 90. PMID 14681588.

## 7. Referenzen

- [15] J. W. Littlefield, D. B. Dunn: The occurrence and distribution of thymine and three methylated-adenine bases in ribonucleic acids from several sources. *The Biochemical journal*, **1958**, 70 (4), 642. PMID 13607422.
- [16] H. Amos, M. Korn: 5-Methyl cytosine in the RNA of Escherichia coli. *Biochimica et biophysica acta*, **1958**, 29 (2), 444. PMID 13572373.
- [17] J. D. Smith, D. B. Dunn: The occurrence of methylated guanines in ribonucleic acids from several sources. *The Biochemical journal*, **1959**, 72 (2), 294. PMID 13662298.
- [18] F. F. Davis, F. W. Allen: Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *The Journal of biological chemistry*, **1957**, 227 (2), 907. PMID 13463012.
- [19] D. B. Dunn: Additional components in ribonucleic acid of rat-liver fractions. *Biochimica et biophysica acta*, **1959**, 34, 286. PMID 13818674.
- [20] W. E. Cohn: 5-Ribosyl uracil, a carbon-carbon ribofuranosyl nucleoside in ribonucleic acids. *Biochimica et biophysica acta*, **1959**, 32, 569. PMID 13811055.
- [21] R. Cortese, H. O. Kammen, S. J. Spengler, B. N. Ames: Biosynthesis of pseudouridine in transfer ribonucleic acid. *The Journal of biological chemistry*, **1974**, 249 (4), 1103. PMID 4592259.
- [22] J. M. Goodenbour, T. Pan: Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic acids research*, **2006**, 34 (21), 6137. PMID 17088292.
- [23] F. Tuorto, C. Legrand, C. Cirzi, G. Federico, R. Liebers, *et al.*: Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *The EMBO journal*, **2018**, 37 (18). PMID 30093495.
- [24] M. Müller, C. Legrand, F. Tuorto, V. P. Kelly, Y. Atlasi, *et al.*: Queuine links translational control in eukaryotes to a micronutrient from bacteria. *Nucleic acids research*, **2019**, 47 (7), 3711. PMID 30715423.
- [25] D. M. Crothers, T. Seno, G. Söll: Is there a discriminator site in transfer RNA? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1972**, 69 (10), 3063. PMID 4562753.
- [26] M. Sprinzl, C. Horn, M. Brown, A. Ioudovitch, S. Steinberg: Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic acids research*, **1998**, 26 (1), 148. PMID 9399820.
- [27] H. D. Robertson, S. Altman, J. D. Smith: Purification and properties of a specific Escherichia coli ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. *The Journal of biological chemistry*, **1972**, 247 (16), 5243. PMID 4560501.
- [28] E. K. Bikoff, B. F. LaRue, M. L. Gefter: In vitro synthesis of transfer RNA. II. Identification of required enzymatic activities. *The Journal of biological chemistry*, **1975**, 250 (16), 6248. PMID 1099090.
- [29] S. Schiffer, S. Rösch, A. Marchfelder: Assigning a function to a conserved group of proteins: the tRNA 3'-processing enzymes. *The EMBO journal*, **2002**, 21 (11), 2769. PMID 12032089.

- [30] E. K. Bikoff, M. L. Gefter: In vitro synthesis of transfer RNA. I. Purification of required components. *The Journal of biological chemistry*, **1975**, 250 (16), 6240. PMID 1099089.
- [31] M. Sprinzl, F. Cramer: The -C-C-A end of tRNA and its role in protein biosynthesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **1979**, 22, 1. PMID 392600.
- [32] S. V. Paushkin, M. Patel, B. S. Furia, S. W. Peltz, C. R. Trotta: Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell*, **2004**, 117 (3), 311. PMID 15109492.
- [33] P. F. Johnson, J. Abelson: The yeast tRNA<sup>Tyr</sup> gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature*, **1983**, 302 (5910), 681. PMID 6339954.
- [34] M. C. Strobel, J. Abelson: Effect of intron mutations on processing and function of *Saccharomyces cerevisiae* SUP53 tRNA in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biology*, **1986**, 6 (7), 2663. PMID 3537724.
- [35] H. van Tol, H. Beier: All human tRNA<sup>Tyr</sup> genes contain introns as a prerequisite for pseudouridine biosynthesis in the anticodon. *Nucleic acids research*, **1988**, 16 (5), 1951. PMID 3357766.
- [36] H. Fu, J. Feng, Q. Liu, F. Sun, Y. Tie, *et al.*: Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS letters*, **2009**, 583 (2), 437. PMID 19114040.
- [37] S. Yamasaki, P. Ivanov, G.-F. Hu, P. Anderson: Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *The Journal of cell biology*, **2009**, 185 (1), 35. PMID 19332886.
- [38] A. Drino, V. Oberbauer, C. Troger, E. Janisiw, D. Anrather, *et al.*: Production and purification of endogenously modified tRNA-derived small RNAs. *RNA biology*, **2020**, 17 (8), 1104. PMID 32138588.
- [39] Y. Akiyama, P. Kharel, T. Abe, P. Anderson, P. Ivanov: Isolation and initial structure-functional characterization of endogenous tRNA-derived stress-induced RNAs. *RNA biology*, **2020**, 17 (8), 1116. PMID 32116132.
- [40] J. Gebetsberger, N. Polacek: Slicing tRNAs to boost functional ncRNA diversity. *RNA biology*, **2013**, 10 (12), 1798. PMID 24351723.
- [41] Z. Li, C. Ender, G. Meister, P. S. Moore, Y. Chang, *et al.*: Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic acids research*, **2012**, 40 (14), 6787. PMID 22492706.
- [42] D. M. Thompson, R. Parker: The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, **2009**, 185 (1), 43. PMID 19332891.
- [43] J. Gebetsberger, M. Zywicki, A. Künzi, N. Polacek: tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, **2012**, 2012, 260909. PMID 23326205.
- [44] A. Sobala, G. Hutvagner: Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells. *RNA biology*, **2013**, 10 (4), 553. PMID 23563448.



## 7. Referenzen

- [45] F. F. Davis, A. F. Carlucci, I. F. Roubein: Trace nucleotides in certain ribonucleic acids from yeast. *The Journal of biological chemistry*, **1959**, 234 (6), 1525. PMID 13654410.
- [46] M. Charette, M. W. Gray: Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB life*, **2000**, 49 (5), 341. PMID 10902565.
- [47] J. D. Robertus, J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. S. Brown, *et al.*: Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature*, **1974**, 250 (467), 546. PMID 4602655.
- [48] R. W. Holley, G. A. Everett, J. T. Madison, A. Zamir: NUCLEOTIDE SEQUENCES IN THE YEAST ALANINE TRANSFER RIBONUCLEIC ACID. *The Journal of biological chemistry*, **1965**, 240, 2122. PMID 14299636.
- [49] F. Voigts-Hoffmann, M. Hengesbach, A. Y. Kobitski, A. van Aerschot, P. Herdewijn, *et al.*: A methyl group controls conformational equilibrium in human mitochondrial tRNA(Lys). *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, 129 (44), 13382. PMID 17941640.
- [50] M. Helm, H. Brulé, F. Degoul, C. Cepanec, J. P. Leroux, *et al.*: The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. *Nucleic acids research*, **1998**, 26 (7), 1636. PMID 9512533.
- [51] P. F. Agris: Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO reports*, **2008**, 9 (7), 629. PMID 18552770.
- [52] H. Grosjean, V. de Crécy-Lagard, C. Marck: Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS letters*, **2010**, 584 (2), 252. PMID 19931533.
- [53] P. C. Durant, A. C. Bajji, M. Sundaram, R. K. Kumar, D. R. Davis: Structural effects of hypermodified nucleosides in the Escherichia coli and human tRNA<sup>Lys</sup> anticodon loop: the effect of nucleosides s2U, mcm5U, mcm5s2U, mnm5s2U, t6A, and ms2t6A. *Biochemistry*, **2005**, 44 (22), 8078. PMID 15924427.
- [54] A. Rozov, N. Demeshkina, I. Khusainov, E. Westhof, M. Yusupov, *et al.*: Novel base-pairing interactions at the tRNA wobble position crucial for accurate reading of the genetic code. *Nature communications*, **2016**, 7, 10457. PMID 26791911.
- [55] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, *et al.*: Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science (New York, N.Y.)*, **1974**, 185 (4149), 435. PMID 4601792.
- [56] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, *et al.*: MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic acids research*, **2013**, 41 (Database issue), D262-7. PMID 23118484.
- [57] F. Spenkuch, Y. Motorin, M. Helm: Pseudouridine: still mysterious, but never a fake (uridine)! *RNA biology*, **2014**, 11 (12), 1540. PMID 25616362.
- [58] P. Auffinger, E. Westhof, in *Modification and Editing of RNA* (Eds.: H. Grosjean, R. Benne), ASM Press, Washington, DC, USA, **1998**, 103.
- [59] J. G. Arnez, T. A. Steitz: Crystal structure of unmodified tRNA(Gln) complexed with glutamyl-tRNA synthetase and ATP suggests a possible role for pseudouridines in stabilization of RNA structure. *Biochemistry*, **1994**, 33 (24), 7560. PMID 8011621.

- [60] D. R. Davis: Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic acids research*, **1995**, 23 (24), 5020. PMID 8559660.
- [61] D. R. Davis, C. A. Veltri, L. Nielsen: An RNA model system for investigation of pseudouridine stabilization of the codon-anticodon interaction in tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>His</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup>. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, **1998**, 15 (6), 1121. PMID 9669557.
- [62] D. R. Davis, in *Modification and Editing of RNA* (Eds.: H. Grosjean, R. Benne), ASM Press, Washington, DC, USA, **1998**, 85.
- [63] P. C. Durant, D. R. Davis: Stabilization of the anticodon stem-loop of tRNA<sup>Lys</sup>,3 by an A+-C base-pair and by pseudouridine. *Journal of molecular biology*, **1999**, 285 (1), 115. PMID 9878393.
- [64] C. S. Yarian, M. M. Basti, R. J. Cain, G. Ansari, R. H. Guenther, *et al.*: Structural and functional roles of the N1- and N3-protons of psi at tRNA's position 39. *Nucleic acids research*, **1999**, 27 (17), 3543. PMID 10446245.
- [65] H. F. Becker, Y. Motorin, R. J. Planta, H. Grosjean: The yeast gene YNL292w encodes a pseudouridine synthase (Pus4) catalyzing the formation of psi<sup>55</sup> in both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *Nucleic acids research*, **1997**, 25 (22), 4493. PMID 9358157.
- [66] J. E. Ladner, A. Jack, J. D. Robertus, R. S. Brown, D. Rhodes, *et al.*: Structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1975**, 72 (11), 4414. PMID 1105583.
- [67] M. E. Saks, J. R. Sampson, J. N. Abelson: The transfer RNA identity problem: a search for rules. *Science (New York, N.Y.)*, **1994**, 263 (5144), 191. PMID 7506844.
- [68] R. Giegé, M. Sissler, C. Florentz: Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic acids research*, **1998**, 26 (22), 5017. PMID 9801296.
- [69] D. C. Larkin, A. M. Williams, S. A. Martinis, G. E. Fox: Identification of essential domains for Escherichia coli tRNA<sup>(leu)</sup> aminoacylation and amino acid editing using minimalist RNA molecules. *Nucleic acids research*, **2002**, 30 (10), 2103. PMID 12000830.
- [70] P. F. Agris, H. Sierzputowska-Gracz, C. Smith: Transfer RNA contains sites of localized positive charge: carbon NMR studies of <sup>13</sup>C-methyl-enriched Escherichia coli and yeast tRNA<sup>Phe</sup>. *Biochemistry*, **1986**, 25 (18), 5126. PMID 3533144.
- [71] S. Steinberg, R. Cedergren: A correlation between N2-dimethylguanosine presence and alternate tRNA conformers. *RNA*, **1995**, 1 (9), 886. PMID 8548653.
- [72] J. Urbonavicius, J. Armengaud, H. Grosjean: Identity elements required for enzymatic formation of N2,N2-dimethylguanosine from N2-monomethylated derivative and its possible role in avoiding alternative conformations in archaeal tRNA. *Journal of molecular biology*, **2006**, 357 (2), 387. PMID 16434050.
- [73] G. D. Johnson, I. L. Pirtle, R. M. Pirtle: The nucleotide sequence of tyrosine tRNA<sup>Q\*</sup> psi A from bovine liver. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1985**, 236 (1), 448. PMID 2981510.

## 7. Referenzen

- [74] H. van Tol, N. Stange, H. J. Gross, H. Beier: A human and a plant intron-containing tRNA<sup>Tyr</sup> gene are both transcribed in a HeLa cell extract but spliced along different pathways. *The EMBO journal*, **1987**, 6 (1), 35. PMID 3502708.
- [75] J. M. Dewe, B. L. Fuller, J. M. Lentini, S. M. Kellner, D. Fu: TRMT1-Catalyzed tRNA Modifications Are Required for Redox Homeostasis To Ensure Proper Cellular Proliferation and Oxidative Stress Survival. *Molecular and cellular biology*, **2017**, 37 (21). PMID 28784718.
- [76] X. Cui, Z. Liang, L. Shen, Q. Zhang, S. Bao, *et al.*: 5-Methylcytosine RNA Methylation in Arabidopsis Thaliana. *Molecular plant*, **2017**, 10 (11), 1387. PMID 28965832.
- [77] T. Huang, W. Chen, J. Liu, N. Gu, R. Zhang: Genome-wide identification of mRNA 5-methylcytosine in mammals. *Nature structural & molecular biology*, **2019**, 26 (5), 380. PMID 31061524.
- [78] Q. Li, X. Li, H. Tang, B. Jiang, Y. Dou, *et al.*: NSUN2-Mediated m5C Methylation and METTL3/METTL14-Mediated m6A Methylation Cooperatively Enhance p21 Translation. *Journal of cellular biochemistry*, **2017**, 118 (9), 2587. PMID 28247949.
- [79] U. Schumann, H.-N. Zhang, T. Sibbritt, A. Pan, A. Horvath, *et al.*: Multiple links between 5-methylcytosine content of mRNA and translation. *BMC biology*, **2020**, 18 (1), 40. PMID 32293435.
- [80] R. García-Vílchez, A. Sevilla, S. Blanco: Post-transcriptional regulation by cytosine-5 methylation of RNA. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, **2019**, 1862 (3), 240. PMID 30593929.
- [81] M. Müller, A. Samel-Pommerencke, C. Legrand, F. Tuorto, F. Lyko, *et al.*: Division of labour: tRNA methylation by the NSun2 tRNA methyltransferases Trm4a and Trm4b in fission yeast. *RNA biology*, **2019**, 16 (3), 249. PMID 30646830.
- [82] R. David, A. Burgess, B. Parker, J. Li, K. Pulsford, *et al.*: Transcriptome-Wide Mapping of RNA 5-Methylcytosine in Arabidopsis mRNAs and Noncoding RNAs. *The Plant cell*, **2017**, 29 (3), 445. PMID 28062751.
- [83] L. Trixl, T. Amort, A. Wille, M. Zinni, S. Ebner, *et al.*: RNA cytosine methyltransferase Nsun3 regulates embryonic stem cell differentiation by promoting mitochondrial activity. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, **2018**, 75 (8), 1483. PMID 29103146.
- [84] L. Yang, V. Perrera, E. Saplaoura, F. Apelt, M. Bahin, *et al.*: m5C Methylation Guides Systemic Transport of Messenger RNA over Graft Junctions in Plants. *Current biology CB*, **2019**, 29 (15), 2465-2476.e5. PMID 31327714.
- [85] C. T. Y. Chan, Y. L. J. Pang, W. Deng, I. R. Babu, M. Dyavaiah, *et al.*: Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nature communications*, **2012**, 3, 937. PMID 22760636.
- [86] S. Blanco, S. Dietmann, J. V. Flores, S. Hussain, C. Kutter, *et al.*: Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *The EMBO journal*, **2014**, 33 (18), 2020. PMID 25063673.

- [87] Y. Chen, H. Sierzputowska-Gracz, R. Guenther, K. Everett, P. F. Agris: 5-Methylcytidine is required for cooperative binding of Mg<sup>2+</sup> and a conformational transition at the anticodon stem-loop of yeast phenylalanine tRNA. *Biochemistry*, **1993**, *32* (38), 10249. PMID 8399153.
- [88] V. Dao, R. H. Guenther, P. F. Agris: The role of 5-methylcytidine in the anticodon arm of yeast tRNA(Phe): site-specific Mg<sup>2+</sup> binding and coupled conformational transition in DNA analogs. *Biochemistry*, **1992**, *31* (45), 11012. PMID 1445839.
- [89] F. Tuorto, F. Herbst, N. Alerasool, S. Bender, O. Popp, *et al.*: The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *The EMBO journal*, **2015**, *34* (18), 2350. PMID 26271101.
- [90] F. Tuorto, R. Liebers, T. Musch, M. Schaefer, S. Hofmann, *et al.*: RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nature structural & molecular biology*, **2012**, *19* (9), 900. PMID 22885326.
- [91] J. E. Jackman, J. D. Alfonzo: Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **2013**, *4* (1), 35. PMID 23139145.
- [92] M. Helm, J. D. Alfonzo: Posttranscriptional RNA Modifications: playing metabolic games in a cell's chemical Legoland. *Chemistry & biology*, **2014**, *21* (2), 174. PMID 24315934.
- [93] P. F. Agris, H. Sierzputowska-Gracz, W. Smith, A. Malkiewicz, E. Sochacka, *et al.*: Thiolation of uridine carbon-2 restricts the motional dynamics of the transfer RNA wobble position nucleoside. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114* (7), 2652.
- [94] H. Sierzputowska-Gracz, E. Sochacka, A. Malkiewicz, K. Kuo, C. W. Gehrke, *et al.*: Chemistry and structure of modified uridines in the anticodon, wobble position of transfer RNA are determined by thiolation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109* (23), 7171.
- [95] S. Yokoyama, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, T. Miyazawa: <sup>1</sup>H NMR studies on the conformational characteristics of 2-thiopyrimidine nucleotides found in transfer RNAs. *Nucleic acids research*, **1979**, *6* (7), 2611. PMID 379825.
- [96] S. Kurata, A. Weixlbaumer, T. Ohtsuki, T. Shimazaki, T. Wada, *et al.*: Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U.G wobble pairing during decoding. *The Journal of biological chemistry*, **2008**, *283* (27), 18801. PMID 18456657.
- [97] F. A. P. Vendeix, F. V. Murphy, W. A. Cantara, G. Leszczyńska, E. M. Gustilo, *et al.*: Human tRNA(Lys3)(UUU) is pre-structured by natural modifications for cognate and wobble codon binding through keto-enol tautomerism. *Journal of molecular biology*, **2012**, *416* (4), 467. PMID 22227389.
- [98] H. Grosjean, E. Westhof: An integrated, structure- and energy-based view of the genetic code. *Nucleic acids research*, **2016**, *44* (17), 8020. PMID 27448410.
- [99] F. Alings, L. P. Sarin, C. Fufezan, H. C. A. Drexler, S. A. Leidel: An evolutionary approach uncovers a diverse response of tRNA 2-thiolation to elevated temperatures in yeast. *RNA*, **2015**, *21* (2), 202. PMID 25505025.
- [100] K. Takai, S. Yokoyama: Roles of 5-substituents of tRNA wobble uridines in the recognition of purine-ending codons. *Nucleic acids research*, **2003**, *31* (22), 6383. PMID 14602896.

## 7. Referenzen

- [101] K. Tomita, T. Ueda, K. Watanabe: The presence of pseudouridine in the anticodon alters the genetic code: a possible mechanism for assignment of the AAA lysine codon as asparagine in echinoderm mitochondria. *Nucleic acids research*, **1999**, 27 (7), 1683. PMID 10076000.
- [102] P. F. Agris: The importance of being modified: roles of modified nucleosides and Mg<sup>2+</sup> in RNA structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **1996**, 53, 79. PMID 8650309.
- [103] G. R. Björk, J. U. Ericson, C. E. Gustafsson, T. G. Hagervall, Y. H. Jönsson, *et al.*: Transfer RNA modification. *Annual review of biochemistry*, **1987**, 56, 263. PMID 3304135.
- [104] J. Cabello-Villegas, M. E. Winkler, E. P. Nikonowicz: Solution conformations of unmodified and A(37)N(6)-dimethylallyl modified anticodon stem-loops of Escherichia coli tRNA(Phe). *Journal of molecular biology*, **2002**, 319 (5), 1015. PMID 12079344.
- [105] J. Cabello-Villegas, I. Tworowska, E. P. Nikonowicz: Metal ion stabilization of the U-turn of the A37 N6-dimethylallyl-modified anticodon stem-loop of Escherichia coli tRNAPhe. *Biochemistry*, **2004**, 43 (1), 55. PMID 14705931.
- [106] V. Dao, R. Guenther, A. Malkiewicz, B. Nawrot, E. Sochacka, *et al.*: Ribosome binding of DNA analogs of tRNA requires base modifications and supports the "extended anticodon". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1994**, 91 (6), 2125. PMID 7510886.
- [107] E. Kierzek, R. Kierzek: The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N6-alkyladenosines and 2-methylthio-N6-alkyladenosines. *Nucleic acids research*, **2003**, 31 (15), 4472. PMID 12888507.
- [108] M. A. Machnicka, A. Olchowik, H. Grosjean, J. M. Bujnicki: Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA biology*, **2014**, 11 (12), 1619. PMID 25611331.
- [109] H. Hori: Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. *Frontiers in genetics*, **2014**, 5, 144. PMID 24904644.
- [110] G. Kawai, Y. Yamamoto, T. Kamimura, T. Masegi, M. Sekine, *et al.*: Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interaction between the base and the 2'-hydroxyl group. *Biochemistry*, **1992**, 31 (4), 1040. PMID 1310418.
- [111] L. Kotelawala, E. J. Grayhack, E. M. Phizicky: Identification of yeast tRNA Um(44) 2'-O-methyltransferase (Trm44) and demonstration of a Trm44 role in sustaining levels of specific tRNA(Ser) species. *RNA*, **2008**, 14 (1), 158. PMID 18025252.
- [112] H. Grosjean, R. Benne: Biophysical and conformational properties of modified nucleosides in RNA (NMR Studies). *Modification and Editing of RNA*, **1998**, Chapter 5.
- [113] H. Hori, T. Suzuki, K. Sugawara, Y. Inoue, T. Shibata, *et al.*: Identification and characterization of tRNA (Gm18) methyltransferase from *Thermus thermophilus* HB8: domain structure and conserved amino acid sequence motifs. *Genes to cells devoted to molecular & cellular mechanisms*, **2002**, 7 (3), 259. PMID 11918670.

- [114] H. Abou Assi, A. K. Rangadurai, H. Shi, B. Liu, M. C. Clay, *et al.*: 2'-O-Methylation can increase the abundance and lifetime of alternative RNA conformational states. *Nucleic acids research*, **2020**, *48* (21), 12365. PMID 33104789.
- [115] G. A. Soukup, R. R. Breaker: Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. *RNA*, **1999**, *5* (10), 1308. PMID 10573122.
- [116] D. G. Dimitrova, L. Teyssset, C. Carré: RNA 2'-O-Methylation (Nm) Modification in Human Diseases. *Genes*, **2019**, *10* (2). PMID 30764532.
- [117] J. R. Katze, B. Basile, J. A. McCloskey: Queuine, a modified base incorporated posttranscriptionally into eukaryotic transfer RNA: wide distribution in nature. *Science (New York, N.Y.)*, **1982**, *216* (4541), 55. PMID 7063869.
- [118] B. P. Doctor, J. E. Loebel, M. A. Sodd, D. B. Winter: Nucleotide sequence of Escherichia coli tyrosine transfer ribonucleic acid. *Science (New York, N.Y.)*, **1969**, *163* (3868), 693. PMID 4883890.
- [119] H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner, J. D. Smith: Amber suppression: a nucleotide change in the anticodon of a tyrosine transfer RNA. *Nature*, **1968**, *217* (5133), 1019. PMID 5643523.
- [120] H. M. Goodman, J. N. Abelson, A. Landy, S. Zadravil, J. D. Smith: The nucleotide sequences of tyrosine transfer RNAs of Escherichia coli. *European journal of biochemistry*, **1970**, *13* (3), 461. PMID 4315419.
- [121] F. Harada, S. Nishimura: Possible anticodon sequences of tRNA His tRNA Asn and tRNA Asp from Escherichia coli B. Universal presence of nucleoside Q in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acids. *Biochemistry*, **1972**, *11* (2), 301. PMID 4550561.
- [122] H. Kasai, Z. Oashi, F. Harada, S. Nishimura, N. J. Oppenheimer, *et al.*: Structure of the modified nucleoside Q isolated from Escherichia coli transfer ribonucleic acid. 7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanosine. *Biochemistry*, **1975**, *14* (19), 4198. PMID 1101947.
- [123] C. Fergus, D. Barnes, M. A. Alqasem, V. P. Kelly: The queuine micronutrient: charting a course from microbe to man. *Nutrients*, **2015**, *7* (4), 2897. PMID 25884661.
- [124] J. P. Reyniers, J. R. Pleasants, B. S. Wostmann, J. R. Katze, W. R. Farkas: Administration of exogenous queuine is essential for the biosynthesis of the queuosine-containing transfer RNAs in the mouse. *The Journal of biological chemistry*, **1981**, *256* (22), 11591. PMID 6795188.
- [125] T. Marks, W. R. Farkas: Effects of a diet deficient in tyrosine and queuine on germfree mice. *Biochemical and biophysical research communications*, **1997**, *230* (2), 233. PMID 9016755.
- [126] S. D. Skolnick, N. H. Greig: Microbes and Monoamines: Potential Neuropsychiatric Consequences of Dysbiosis. *Trends in neurosciences*, **2019**, *42* (3), 151. PMID 30795845.
- [127] B. El Yacoubi, M. Bailly, V. de Crécy-Lagard: Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annual review of genetics*, **2012**, *46*, 69. PMID 22905870.

## 7. Referenzen

- [128] N. Okada, S. Noguchi, S. Nishimura, T. Ohgi, T. Goto, *et al.*: Structure determination of a nucleoside Q precursor isolated from *E. coli* tRNA: 7-(aminomethyl)-7-deazaguanosine. *Nucleic acids research*, **1978**, *5* (7), 2289. PMID 353740.
- [129] R. M. McCarty, A. Somogyi, V. Bandarian: Escherichia coli QueD is a 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase. *Biochemistry*, **2009**, *48* (11), 2301. PMID 19231875.
- [130] R. M. McCarty, A. Somogyi, G. Lin, N. E. Jacobsen, V. Bandarian: The deazapurine biosynthetic pathway revealed: in vitro enzymatic synthesis of PreQ(0) from guanosine 5'-triphosphate in four steps. *Biochemistry*, **2009**, *48* (18), 3847. PMID 19354300.
- [131] J. S. Reader, D. Metzgar, P. Schimmel, V. de Crécy-Lagard: Identification of four genes necessary for biosynthesis of the modified nucleoside queuosine. *The Journal of biological chemistry*, **2004**, *279* (8), 6280. PMID 14660578.
- [132] G. Phillips, B. El Yacoubi, B. Lyons, S. Alvarez, D. Iwata-Reuyl, *et al.*: Biosynthesis of 7-deazaguanosine-modified tRNA nucleosides: a new role for GTP cyclohydrolase I. *Journal of bacteriology*, **2008**, *190* (24), 7876. PMID 18931107.
- [133] D. P. Dowling, N. A. Bruender, A. P. Young, R. M. McCarty, V. Bandarian, *et al.*: Radical SAM enzyme QueE defines a new minimal core fold and metal-dependent mechanism. *Nature chemical biology*, **2014**, *10* (2), 106. PMID 24362703.
- [134] A. W. Curnow, G. A. Garcia: tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: recognition of dimeric, unmodified tRNA(Tyr). *Biochimie*, **1994**, *76* (12), 1183. PMID 7748954.
- [135] S. Noguchi, Y. Nishimura, Y. Hirota, S. Nishimura: Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA. *The Journal of biological chemistry*, **1982**, *257* (11), 6544. PMID 6804468.
- [136] Z. D. Miles, R. M. McCarty, G. Molnar, V. Bandarian: Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2011**, *108* (18), 7368. PMID 21502530.
- [137] K. Reuter, R. Slany, F. Ullrich, H. Kersten: Structure and organization of *Escherichia coli* genes involved in biosynthesis of the deazaguanine derivative queuine, a nutrient factor for eukaryotes. *Journal of bacteriology*, **1991**, *173* (7), 2256. PMID 1706703.
- [138] R. K. Slany, M. Bösl, H. Kersten: Transfer and isomerization of the ribose moiety of AdoMet during the biosynthesis of queuosine tRNAs, a new unique reaction catalyzed by the QueA protein from *Escherichia coli*. *Biochimie*, **1994**, *76* (5), 389. PMID 7849103.
- [139] D. W. Phillipson, C. G. Edmonds, P. F. Crain, D. L. Smith, D. R. Davis, *et al.*: Isolation and structure elucidation of an epoxide derivative of the hypermodified nucleoside queuosine from *Escherichia coli* transfer RNA. *The Journal of biological chemistry*, **1987**, *262* (8), 3462. PMID 3102486.



- [140] J. C. Salazar, A. Ambrogelly, P. F. Crain, J. A. McCloskey, D. Söll: A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, *101* (20), 7536. PMID 15096612.
- [141] R. Zallot, R. Ross, W.-H. Chen, S. D. Bruner, P. A. Limbach, *et al.*: Identification of a Novel Epoxyqueuosine Reductase Family by Comparative Genomics. *ACS chemical biology*, **2017**, *12* (3), 844. PMID 28128549.
- [142] H. Kasai, Y. Kuchino, K. Nihei, S. Nishimura: Distribution of the modified nucleoside Q and its derivatives in animal and plant transfer RNA's. *Nucleic acids research*, **1975**, *2* (10), 1931. PMID 1187350.
- [143] H. Kasai, K. Nakanishi, R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, Z. Ohashi, *et al.*: Letter: The structure of Q\* nucleoside isolated from rabbit liver transfer ribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98* (16), 5044. PMID 950430.
- [144] P. Thumbs: Synthese der natürlichen tRNA-Modifikation Galaktosylqueuosin und Untersuchungen zur Struktur der natürlichen tRNA-Modifikation Mannosylqueuosin. *Ludwig-Maximilians-Universität München*, **2013** (Dissertation).
- [145] Timm Taylan Ensfielder: Studie zu seltenen RNA-Modifikationen. *Ludwig-Maximilians-Universität München*, **2020** (Dissertation).
- [146] N. Okada, N. Shindo-Okada, S. Nishimura: Isolation of mammalian tRNA<sup>Asp</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup> by lectin-Sepharose affinity column chromatography. *Nucleic acids research*, **1977**, *4* (2), 415. PMID 190593.
- [147] R. C. Morris, B. J. Brooks, P. Eriotou, D. F. Kelly, S. Sagar, *et al.*: Activation of transfer RNA-guanine ribosyltransferase by protein kinase C. *Nucleic acids research*, **1995**, *23* (13), 2492. PMID 7630727.
- [148] R. C. Morris, B. J. Brooks, K. L. Hart, M. S. Elliott: Modulation of queuine uptake and incorporation into tRNA by protein kinase C and protein phosphatase. *Biochimica et biophysica acta*, **1996**, *1311* (2), 124. PMID 8630330.
- [149] R. C. Morris, M. C. Galicia, K. L. Clase, M. S. Elliott: Determination of queuosine modification system deficiencies in cultured human cells. *Molecular genetics and metabolism*, **1999**, *68* (1), 56. PMID 10479483.
- [150] R. K. Slany, S. O. Müller: tRNA-guanine transglycosylase from bovine liver. Purification of the enzyme to homogeneity and biochemical characterization. *European journal of biochemistry*, **1995**, *230* (1), 221. PMID 7601103.
- [151] U. Gündüz, J. R. Katze: Salvage of the nucleic acid base queuine from queuine-containing TRNA by animal cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **1982**, *109* (1), 159. PMID 6925449.
- [152] U. Gündüz, J. R. Katze: Queuine salvage in mammalian cells. Evidence that queuine is generated from queuosine 5'-phosphate. *The Journal of biological chemistry*, **1984**, *259* (2), 1110. PMID 6319378.
- [153] N. K. Howes, W. R. Farkas: Studies with a homogeneous enzyme from rabbit erythrocytes catalyzing the insertion of guanine into tRNA. *The Journal of biological chemistry*, **1978**, *253* (24), 9082. PMID 721832.

## 7. Referenzen

- [154] J. R. Katze, W. R. Farkas: A factor in serum and amniotic fluid is a substrate for the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1979**, 76 (7), 3271. PMID 291001.
- [155] N. Okada, S. Noguchi, H. Kasai, N. Shindo-Okada, T. Ohgi, *et al.*: Novel mechanism of post-transcriptional modification of tRNA. Insertion of bases of Q precursors into tRNA by a specific tRNA transglycosylase reaction. *The Journal of biological chemistry*, **1979**, 254 (8), 3067. PMID 372186.
- [156] W. R. Farkas, R. D. Singh: Guanylation of transfer ribonucleic acid by a cell-free lysate of rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry*, **1973**, 248 (22), 7780. PMID 4750426.
- [157] C. Boland, P. Hayes, I. Santa-Maria, S. Nishimura, V. P. Kelly: Queuosine formation in eukaryotic tRNA occurs via a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase. *The Journal of biological chemistry*, **2009**, 284 (27), 18218. PMID 19414587.
- [158] T. Ritschel, C. Atmanene, K. Reuter, A. van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani, *et al.*: An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction. *Journal of molecular biology*, **2009**, 393 (4), 833. PMID 19627989.
- [159] A. W. Curnow, G. A. Garcia: tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. Minimal tRNA structure and sequence requirements for recognition. *The Journal of biological chemistry*, **1995**, 270 (29), 17264. PMID 7615526.
- [160] E. Haumont, L. Droogmans, H. Grosjean: Enzymatic formation of queuosine and of glycosyl queuosine in yeast tRNAs microinjected into *Xenopus laevis* oocytes. The effect of the anticodon loop sequence. *European journal of biochemistry*, **1987**, 168 (1), 219. PMID 3117541.
- [161] P. P. Chan, T. M. Lowe: GtRNAdb 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes. *Nucleic acids research*, **2016**, 44 (D1), D184-9. PMID 26673694.
- [162] B. Y. Lin, P. P. Chan, T. M. Lowe: tRNAviz: explore and visualize tRNA sequence features. *Nucleic acids research*, **2019**, 47 (W1), W542-W547. PMID 31127306.
- [163] T. Pan: Modifications and functional genomics of human transfer RNA. *Cell research*, **2018**, 28 (4), 395. PMID 29463900.
- [164] F. Meier, B. Suter, H. Grosjean, G. Keith, E. Kubli: Queuosine modification of the wobble base in tRNA<sup>His</sup> influences 'in vivo' decoding properties. *The EMBO journal*, **1985**, 4 (3), 823. PMID 2988936.
- [165] W. R. Farkas: Effect of diet on the queuosine family of tRNAs of germ-free mice. *The Journal of biological chemistry*, **1980**, 255 (14), 6832. PMID 6771278.
- [166] G. Ott, H. Kersten: Differential turnover of tRNAs of the queuosine family in *Dictyostelium discoideum* and its possible role in regulation. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, **1985**, 366 (1), 69. PMID 2408636.
- [167] M. Schaefer, T. Pollex, K. Hanna, F. Tuorto, M. Meusburger, *et al.*: RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes & development*, **2010**, 24 (15), 1590. PMID 20679393.

- [168] S. Johannsson, P. Neumann, A. Wulf, L. M. Welp, H.-D. Gerber, *et al.*: Structural insights into the stimulation of *S. pombe* Dnmt2 catalytic efficiency by the tRNA nucleoside queuosine. *Sci Rep*, **2018**, *8* (1), 8880. PMID 29892076.
- [169] T. P. Jurkowski, R. Shanmugam, M. Helm, A. Jeltsch: Mapping the tRNA binding site on the surface of human DNMT2 methyltransferase. *Biochemistry*, **2012**, *51* (22), 4438. PMID 22591353.
- [170] A. E. Ehrenhofer-Murray: Cross-Talk between Dnmt2-Dependent tRNA Methylation and Queuosine Modification. *Biomolecules*, **2017**, *7* (1). PMID 28208632.
- [171] H. Beier, M. Barciszewska, H. D. Sickinger: The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts. *The EMBO journal*, **1984**, *3* (5), 1091. PMID 16453524.
- [172] K. Zerfass, H. Beier: Pseudouridine in the anticodon G psi A of plant cytoplasmic tRNA(Tyr) is required for UAG and UAA suppression in the TMV-specific context. *Nucleic acids research*, **1992**, *20* (22), 5911. PMID 1461724.
- [173] J. Karijolic, Y.-T. Yu: Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature*, **2011**, *474* (7351), 395. PMID 21677757.
- [174] I. S. Fernández, C. L. Ng, A. C. Kelley, G. Wu, Y.-T. Yu, *et al.*: Unusual base pairing during the decoding of a stop codon by the ribosome. *Nature*, **2013**, *500* (7460), 107. PMID 23812587.
- [175] M. Bienz, E. Kubli: Wild-type tRNA<sup>Tyr</sup>G reads the TMV RNA stop codon, but Q base-modified tRNA<sup>Tyr</sup>Q does not. *Nature*, **1981**, *294* (5837), 188. PMID 29451243.
- [176] S. Kaufman: A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *The Journal of biological chemistry*, **1958**, *230* (2), 931. PMID 13525410.
- [177] S. Kaufman: Studies on the mechanism of the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *The Journal of biological chemistry*, **1959**, *234*, 2677. PMID 14404870.
- [178] S. Kaufman: The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1963**, *50*, 1085. PMID 14096182.
- [179] S. Kaufman: Metabolism of the phenylalanine hydroxylation cofactor. *The Journal of biological chemistry*, **1967**, *242* (17), 3934. PMID 4382563.
- [180] T. Rakovich, C. Boland, I. Bernstein, V. M. Chikwana, D. Iwata-Reuyl, *et al.*: Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation. *The Journal of biological chemistry*, **2011**, *286* (22), 19354. PMID 21487017.
- [181] C. Pathak, Y. K. Jaiswal, M. Vinayak: Queuine promotes antioxidant defence system by activating cellular antioxidant enzyme activities in cancer. *Bioscience reports*, **2008**, *28* (2), 73. PMID 18290765.
- [182] W. C. Clark, M. E. Evans, D. Dominissini, G. Zheng, T. Pan: tRNA base methylation identification and quantification via high-throughput sequencing. *RNA (New York, N.Y.)*, **2016**, *22* (11), 1771. PMID 27613580.

## 7. Referenzen

- [183] C. T. Y. Chan, M. Dyavaiah, M. S. DeMott, K. Taghizadeh, P. C. Dedon, *et al.*: A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS genetics*, **2010**, *6* (12), e1001247. PMID 21187895.
- [184] S. Schwartz, D. A. Bernstein, M. R. Mumbach, M. Jovanovic, R. H. Herbst, *et al.*: Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, **2014**, *159* (1), 148. PMID 25219674.
- [185] S. Hussain, A. A. Sajini, S. Blanco, S. Dietmann, P. Lombard, *et al.*: NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell reports*, **2013**, *4* (2), 255. PMID 23871666.
- [186] V. Khoddami, B. R. Cairns: Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases. *Nature biotechnology*, **2013**, *31* (5), 458. PMID 23604283.
- [187] J. E. Squires, H. R. Patel, M. Nousch, T. Sibbritt, D. T. Humphreys, *et al.*: Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic acids research*, **2012**, *40* (11), 5023. PMID 22344696.
- [188] S. M. Huber, P. van Delft, L. Mendil, M. Bachman, K. Smollett, *et al.*: Formation and abundance of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *Chembiochem a European journal of chemical biology*, **2015**, *16* (5), 752. PMID 25676849.
- [189] D.-Q. Shi, I. Ali, J. Tang, W.-C. Yang: New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function. *Frontiers in genetics*, **2017**, *8*, 100. PMID 28769976.
- [190] Y. Xiang, B. Laurent, C.-H. Hsu, S. Nachtergaele, Z. Lu, *et al.*: RNA m6A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. *Nature*, **2017**, *543* (7646), 573. PMID 28297716.
- [191] Y. Mishina, E. M. Duguid, C. He: Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chemical reviews*, **2006**, *106* (2), 215. PMID 16464003.
- [192] Z. You, S. Omura, H. Ikeda, D. E. Cane, G. Jogl: Crystal Structure of the Non-heme Iron Dioxygenase PtlH in Pentalenolactone Biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, **2007**, *282* (50), 36552. PMID 17942405.
- [193] F. Liu, W. Clark, G. Luo, X. Wang, Y. Fu, *et al.*: ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation. *Cell*, **2016**, *167* (3), 816-828.e16. PMID 27745969.
- [194] R. Ougland, C.-M. Zhang, A. Liiv, R. F. Johansen, E. Seeberg, *et al.*: AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Molecular cell*, **2004**, *16* (1), 107. PMID 15469826.
- [195] Y. Ueda, I. Ooshio, Y. Fusamae, K. Kitae, M. Kawaguchi, *et al.*: AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells. *Scientific reports*, **2017**, *7*, 42271. PMID 28205560.
- [196] D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, *et al.*: Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, **2012**, *485* (7397), 201. PMID 22575960.

- [197] X. Yang, Y. Yang, B.-F. Sun, Y.-S. Chen, J.-W. Xu, *et al.*: 5-methylcytosine promotes mRNA export - NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m5C reader. *Cell research*, **2017**, 27 (5), 606. PMID 28418038.
- [198] T. L. de Jager, A. E. Cockrell, S. S. Du Plessis: Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. *Advances in experimental medicine and biology*, **2017**, 996, 15. PMID 29124687.
- [199] M. Liu, F. Chen, T. Liu, F. Chen, S. Liu, *et al.*: The role of oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes and infection*, **2017**, 19 (12), 580. PMID 28918004.
- [200] A. Daiber, S. Kröller-Schön, M. Oelze, O. Hahad, H. Li, *et al.*: Oxidative stress and inflammation contribute to traffic noise-induced vascular and cerebral dysfunction via uncoupling of nitric oxide synthases. *Redox biology*, **2020**, 34, 101506. PMID 32371009.
- [201] J. E. Klaunig: Oxidative Stress and Cancer. *Current pharmaceutical design*, **2018**, 24 (40), 4771. PMID 30767733.
- [202] L. L. Yan, H. S. Zaher: How do cells cope with RNA damage and its consequences? *The Journal of biological chemistry*, **2019**, 294 (41), 15158. PMID 31439666.
- [203] W. Ding, L. J. Smulan, N. S. Hou, S. Taubert, J. L. Watts, *et al.*: s-Adenosylmethionine Levels Govern Innate Immunity through Distinct Methylation-Dependent Pathways. *Cell metabolism*, **2015**, 22 (4), 633. PMID 26321661.
- [204] E. Radi, P. Formichi, C. Battisti, A. Federico: Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease JAD*, **2014**, 42 Suppl 3, S125-52. PMID 25056458.
- [205] C. Yi, C. He: DNA repair by reversal of DNA damage. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2013**, 5 (1), a012575. PMID 23284047.
- [206] P. A. Aas, M. Otterlei, P. O. Falnes, C. B. Vågbø, F. Skorpen, *et al.*: Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, **2003**, 421 (6925), 859. PMID 12594517.
- [207] N. Jonkhout, J. Tran, M. A. Smith, N. Schonrock, J. S. Mattick, *et al.*: The RNA modification landscape in human disease. *RNA*, **2017**, 23 (12), 1754. PMID 28855326.
- [208] I. Barbieri, T. Kouzarides: Role of RNA modifications in cancer. *Nature reviews. Cancer*, **2020**, 20 (6), 303. PMID 32300195.
- [209] I. Ohshio, R. Kawakami, Y. Tsukada, K. Nakajima, K. Kitae, *et al.*: ALKBH8 promotes bladder cancer growth and progression through regulating the expression of survivin. *Biochemical and biophysical research communications*, **2016**, 477 (3), 413. PMID 27329810.
- [210] K. Shimada, M. Nakamura, S. Anai, M. de Velasco, M. Tanaka, *et al.*: A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. *Cancer research*, **2009**, 69 (7), 3157. PMID 19293182.
- [211] S. Delaunay, F. Rapino, L. Tharun, Z. Zhou, L. Heukamp, *et al.*: Elp3 links tRNA modification to IRES-dependent translation of LEF1 to sustain metastasis in breast cancer. *The Journal of experimental medicine*, **2016**, 213 (11), 2503. PMID 27811057.

## 7. Referenzen

- [212] S. Hussain, Z. I. Bashir: The epitranscriptome in modulating spatiotemporal RNA translation in neuronal post-synaptic function. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2015**, 9, 420. PMID 26582006.
- [213] J. K. Alder, E. M. Parry, S. Yegnasubramanian, C. L. Wagner, L. M. Lieblich, *et al.*: Telomere phenotypes in females with heterozygous mutations in the dyskeratosis congenita 1 (DKC1) gene. *Human mutation*, **2013**, 34 (11), 1481. PMID 23946118.
- [214] J. Carrillo, P. Martínez, J. Solera, C. Moratilla, A. González, *et al.*: High resolution melting analysis for the identification of novel mutations in DKC1 and TERT genes in patients with dyskeratosis congenita. *Blood cells, molecules & diseases*, **2012**, 49 (3-4), 140. PMID 22664374.
- [215] N. R. Thumati, X.-L. Zeng, H. H. T. Au, C. J. Jang, E. Jan, *et al.*: Severity of X-linked dyskeratosis congenita (DKCX) cellular defects is not directly related to dyskerin (DKC1) activity in ribosomal RNA biogenesis or mRNA translation. *Human mutation*, **2013**, 34 (12), 1698. PMID 24115260.
- [216] M. L. Gatz, G. O. Silva, J. S. Parker, C. Fan, C. M. Perou: An integrated genomics approach identifies drivers of proliferation in luminal-subtype human breast cancer. *Nature genetics*, **2014**, 46 (10), 1051. PMID 25151356.
- [217] X.-L. Tan, A. M. Moyer, B. L. Fridley, D. J. Schaid, N. Niu, *et al.*: Genetic variation predicting cisplatin cytotoxicity associated with overall survival in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research*, **2011**, 17 (17), 5801. PMID 21775533.
- [218] L. Abbasi-Moheb, S. Mertel, M. Gonsior, L. Nouri-Vahid, K. Kahrizi, *et al.*: Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability. *American journal of human genetics*, **2012**, 90 (5), 847. PMID 22541559.
- [219] M. A. Khan, M. A. Rafiq, A. Noor, S. Hussain, J. V. Flores, *et al.*: Mutation in NSUN2, which encodes an RNA methyltransferase, causes autosomal-recessive intellectual disability. *American journal of human genetics*, **2012**, 90 (5), 856. PMID 22541562.
- [220] F. J. Martinez, J. H. Lee, J. E. Lee, S. Blanco, E. Nickerson, *et al.*: Whole exome sequencing identifies a splicing mutation in NSUN2 as a cause of a Dubowitz-like syndrome. *Journal of medical genetics*, **2012**, 49 (6), 380. PMID 22577224.
- [221] S. Fahiminiya, M. Almuriekh, Z. Nawaz, A. Staffa, P. Lepage, *et al.*: Whole exome sequencing unravels disease-causing genes in consanguineous families in Qatar. *Clinical genetics*, **2014**, 86 (2), 134. PMID 24102521.
- [222] T. W. Yew, L. McCreight, K. Colclough, S. Ellard, E. R. Pearson: tRNA methyltransferase homologue gene TRMT10A mutation in young adult-onset diabetes with intellectual disability, microcephaly and epilepsy. *Diabetic medicine a journal of the British Diabetic Association*, **2016**, 33 (9), e21-5. PMID 26526202.
- [223] A. Zung, M. Kori, E. Burundukov, T. Ben-Yosef, Y. Tator, *et al.*: Homozygous deletion of TRMT10A as part of a contiguous gene deletion in a syndrome of failure to thrive, delayed puberty, intellectual disability and diabetes mellitus. *American journal of medical genetics. Part A*, **2015**, 167A (12), 3167. PMID 26297882.

- [224] R. Shaheen, G. M. H. Abdel-Salam, M. P. Guy, R. Alomar, M. S. Abdel-Hamid, *et al.*: Mutation in WDR4 impairs tRNA m(7)G46 methylation and causes a distinct form of microcephalic primordial dwarfism. *Genome biology*, **2015**, *16*, 210. PMID 26416026.
- [225] B. Davarniya, H. Hu, K. Kahrizi, L. Musante, Z. Fattahi, *et al.*: The Role of a Novel TRMT1 Gene Mutation and Rare GRM1 Gene Defect in Intellectual Disability in Two Azeri Families. *PloS one*, **2015**, *10* (8), e0129631. PMID 26308914.
- [226] M. Kohli, S. M. Riska, D. W. Mahoney, H. S. Chai, D. W. Hillman, *et al.*: Germline predictors of androgen deprivation therapy response in advanced prostate cancer. *Mayo Clinic proceedings*, **2012**, *87* (3), 240. PMID 22386179.
- [227] Y. P. Yu, Y. Ding, Z. Chen, S. Liu, A. Michalopoulos, *et al.*: Novel fusion transcripts associate with progressive prostate cancer. *The American journal of pathology*, **2014**, *184* (10), 2840. PMID 25238935.
- [228] M. D. Metodiev, K. Thompson, C. L. Alston, A. A. M. Morris, L. He, *et al.*: Recessive Mutations in TRMT10C Cause Defects in Mitochondrial RNA Processing and Multiple Respiratory Chain Deficiencies. *American journal of human genetics*, **2016**, *99* (1), 246. PMID 27392079.
- [229] A. Tan, Y. Dang, G. Chen, Z. Mo: Overexpression of the fat mass and obesity associated gene (FTO) in breast cancer and its clinical implications. *International journal of clinical and experimental pathology*, **2015**, *8* (10), 13405. PMID 26722548.
- [230] Z. Li, H. Weng, R. Su, X. Weng, Z. Zuo, *et al.*: FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N6-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer cell*, **2017**, *31* (1), 127. PMID 28017614.
- [231] J. Zhao, Y. Zhao, L. Wang, J. Zhang, R. J. Karnes, *et al.*: Alterations of androgen receptor-regulated enhancer RNAs (eRNAs) contribute to enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, **2016**, *7* (25), 38551. PMID 27221037.
- [232] S. Kimura, P. C. Dedon, M. K. Waldor: Comparative tRNA sequencing and RNA mass spectrometry for surveying tRNA modifications. *Nature chemical biology*, **2020**, *16* (9), 964. PMID 32514182.
- [233] F. Hagelskamp, K. Borland, J. Ramos, A. G. Hendrick, D. Fu, *et al.*: Broadly applicable oligonucleotide mass spectrometry for the analysis of RNA writers and erasers in vitro. *Nucleic acids research*, **2020**, *48* (7), e41. PMID 32083657.
- [234] P. A. Lobue, M. Jora, B. Addepalli, P. A. Limbach: Oligonucleotide Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Absence of Ion-Pair Reagents. *Journal of chromatography. A*, **2019**, *1595*, 39. PMID 30772056.
- [235] R. Schnieders, S. Keyhani, H. Schwalbe, B. Fürtig: More than Proton Detection- New Avenues for NMR Spectroscopy of RNA. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **2020**, *26* (1), 102. PMID 31454110.
- [236] A. Bakin, J. Ofengand: Four newly located pseudouridylate residues in Escherichia coli 23S ribosomal RNA are all at the peptidyltransferase center: analysis by the application of a new sequencing technique. *Biochemistry*, **1993**, *32* (37), 9754. PMID 8373778.



## 7. Referenzen

- [237] A. Durairaj, P. A. Limbach: Improving CMC-derivatization of pseudouridine in RNA for mass spectrometric detection. *Analytica chimica acta*, **2008**, 612 (2), 173. PMID 18358863.
- [238] K. Slama, A. Galliot, F. Weichmann, J. Hertler, R. Feederle, *et al.*: Determination of enrichment factors for modified RNA in MeRIP experiments. *Methods (San Diego, Calif.)*, **2019**, 156, 102. PMID 30394295.
- [239] G. L. Igloi, H. Kössel: Affinity electrophoresis for monitoring terminal phosphorylation and the presence of queuosine in RNA. Application of polyacrylamide containing a covalently bound boronic acid. *Nucleic acids research*, **1985**, 13 (19), 6881. PMID 2414733.
- [240] M. Heiss, S. Kellner: Detection of nucleic acid modifications by chemical reagents. *RNA biology*, **2017**, 14 (9), 1166. PMID 27901634.
- [241] M. Karas, F. Hillenkamp: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, **1988**, 60 (20), 2299. PMID 3239801.
- [242] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)*, **1989**, 246 (4926), 64. PMID 2675315.
- [243] F. Kirpekar, S. Douthwaite, P. Roepstorff: Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry. *RNA*, **2000**, 6 (2), 296. PMID 10688367.
- [244] S. Douthwaite, F. Kirpekar: Identifying modifications in RNA by MALDI mass spectrometry. *Methods in enzymology*, **2007**, 425, 3. PMID 17673077.
- [245] E. Nordhoff, F. Kirpekar, P. Roepstorff: Mass spectrometry of nucleic acids. *Mass Spectrom. Rev.*, **1996**, 15 (2), 67.
- [246] E. Nordhoff, F. Kirpekar, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, *et al.*: Comparison of IR- and UV-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligodeoxynucleotides. *Nucleic acids research*, **1994**, 22 (13), 2460. PMID 8041606.
- [247] P. F. Crain, J. A. McCloskey: Applications of mass spectrometry to the characterization of oligonucleotides and nucleic acids. *Current opinion in biotechnology*, **1998**, 9 (1), 25. PMID 9503584.
- [248] S. C. Pomerantz, J. A. McCloskey: Analysis of RNA hydrolyzates by liquid chromatography-mass spectrometry. *Methods in enzymology*, **1990**, 193, 796. PMID 1706064.
- [249] S. P. Waghmare, M. J. Dickman: Characterization and quantification of RNA post-transcriptional modifications using stable isotope labeling of RNA in conjunction with mass spectrometry analysis. *Analytical chemistry*, **2011**, 83 (12), 4894. PMID 21539333.
- [250] D. Su, C. T. Y. Chan, C. Gu, K. S. Lim, Y. H. Chionh, *et al.*: Quantitative analysis of ribonucleoside modifications in tRNA by HPLC-coupled mass spectrometry. *Nature protocols*, **2014**, 9 (4), 828. PMID 24625781.
- [251] V. F. Reichle, D. P. Petrov, V. Weber, K. Jung, S. Kellner: NAIL-MS reveals the repair of 2-methylthiocytidine by AlkB in *E. coli*. *Nature communications*, **2019**, 10 (1), 5600. PMID 31811240.

- [252] S. Kellner, J. Neumann, D. Rosenkranz, S. Lebedeva, R. F. Ketting, *et al.*: Profiling of RNA modifications by multiplexed stable isotope labelling. *Chemical communications (Cambridge, England)*, **2014**, 50 (26), 3516. PMID 24567952.
- [253] P. L. Urban: Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, **2016**, 374 (2079). PMID 27644965.
- [254] F. R. Traube, S. Schiffers, K. Iwan, S. Kellner, F. Spada, *et al.*: Isotope-dilution mass spectrometry for exact quantification of noncanonical DNA nucleosides. *Nature protocols*, **2019**, 14 (1), 283. PMID 30559375.
- [255] S. A. Barker, J. A. Bassham, M. Calvin, U. C. Quarck: Intermediates in the photosynthetic cycle. *Biochimica et biophysica acta*, **1956**, 21 (2), 376. PMID 13363921.
- [256] M. Meselson, F. W. Stahl: The replication of DNA in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1958**, 44 (7), 671. PMID 16590258.
- [257] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, *et al.*: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics MCP*, **2002**, 1 (5), 376. PMID 12118079.
- [258] M. Mann: Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **2006**, 7 (12), 952. PMID 17139335.
- [259] K. Lu, Y. Miyazaki, M. F. Summers: Isotope labeling strategies for NMR studies of RNA. *Journal of biomolecular NMR*, **2010**, 46 (1), 113. PMID 19789981.
- [260] T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, C. Brandmayr, S. K. Laube, *et al.*: Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nature chemical biology*, **2014**, 10 (7), 574. PMID 24838012.
- [261] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeyer, *et al.*: Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **2012**, 51 (26), 6516. PMID 22644704.
- [262] S. M. Huber, P. van Delft, A. Tanpure, E. A. Miska, S. Balasubramanian: 2'-O-Methyl-5-hydroxymethylcytidine: A Second Oxidative Derivative of 5-Methylcytidine in RNA. *Journal of the American Chemical Society*, **2017**, 139 (5), 1766. PMID 28107630.
- [263] M. J. Paulines, P. A. Limbach: Comparative Analysis of Ribonucleic Acid Digests (CARD) by Mass Spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2017**, 1562, 19. PMID 28349451.
- [264] M. J. Paulines, P. A. Limbach: Stable Isotope Labeling for Improved Comparative Analysis of RNA Digests by Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2017**, 28 (3), 551. PMID 28105550.
- [265] C. Dal Magro, P. Keller, A. Kotter, S. Werner, V. Duarte, *et al.*: A Vastly Increased Chemical Variety of RNA Modifications Containing a Thioacetal Structure. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **2018**, 57 (26), 7893. PMID 29624844.

## 7. Referenzen

- [266] C. Brandmayr, M. Wagner, T. Brückl, D. Globisch, D. Pearson, *et al.*: Isotope-based analysis of modified tRNA nucleosides correlates modification density with translational efficiency. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **2012**, *51* (44), 11162. PMID 23037940.
- [267] S. Kellner, A. Ochel, K. Thüring, F. Spenkuch, J. Neumann, *et al.*: Absolute and relative quantification of RNA modifications via biosynthetic isotopomers. *Nucleic acids research*, **2014**, *42* (18), e142. PMID 25129236.
- [268] A. M. Popova, J. R. Williamson: Quantitative analysis of rRNA modifications using stable isotope labeling and mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136* (5), 2058. PMID 24422502.
- [269] P. Asadi-Atoi, P. Barraud, C. Tisne, S. Kellner: Benefits of stable isotope labeling in RNA analysis. *Biological chemistry*, **2019**, *400* (7), 847. PMID 30893050.
- [270] K. Borland, J. Diesend, T. Ito-Kureha, V. Heissmeyer, C. Hammann, *et al.*: Production and Application of Stable Isotope-Labeled Internal Standards for RNA Modification Analysis. *Genes*, **2019**, *10* (1). PMID 30621251.
- [271] V. F. Reichle, V. Weber, S. Kellner: NAIL-MS in E. coli Determines the Source and Fate of Methylation in tRNA. *Chembiochem a European journal of chemical biology*, **2018**, *19* (24), 2575. PMID 30328661.
- [272] V. F. Reichle: Untersuchung von RNA-Modifikationen in Bakterien und Nematoden. *Ludwig-Maximilians-Universität München*, **2020** (Dissertation).
- [273] M. Heiss, V. F. Reichle, S. Kellner: Observing the fate of tRNA and its modifications by nucleic acid isotope labeling mass spectrometry: NAIL-MS. *RNA biology*, **2017**, *14* (9), 1260. PMID 28488916.
- [274] C.-Y. Fang, C.-C. Wu, C.-L. Fang, W.-Y. Chen, C.-L. Chen: Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PloS one*, **2017**, *12* (6), e0178960. PMID 28591207.
- [275] L. Liu, J. Wang, S. Duan, L. Chen, H. Xiang, *et al.*: Systematic evaluation of sericin protein as a substitute for fetal bovine serum in cell culture. *Sci Rep*, **2016**, *6* (1), 31516. PMID 27531556.
- [276] U. Karnahl, C. Wasternack: Half-life of cytoplasmic rRNA and tRNA, of plastid rrna and of uridine nucleotides in heterotrophically and photoorganotrophically grown cells of *Euglena gracilis* and its apoplastic mutant W3BUL. *The International journal of biochemistry*, **1992**, *24* (3), 493. PMID 1551462.
- [277] M. Taoka, Y. Nobe, Y. Yamaki, K. Sato, H. Ishikawa, *et al.*: Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic acids research*, **2018**, *46* (18), 9289. PMID 30202881.
- [278] R. H. Pittman, M. T. Andrews, D. R. Setzer: A feedback loop coupling 5 S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. *The Journal of biological chemistry*, **1999**, *274* (47), 33198. PMID 10559190.
- [279] D. W. Smith, W. C. Weinberg: Transfer RNA in reticulocyte maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, **1981**, *655* (2), 195.
- [280] A. Popov, E. Smirnov, L. Kováčik, O. Raška, G. Hagen, *et al.*: Duration of the first steps of the human rRNA processing. *Nucleus (Austin, Tex.)*, **2013**, *4* (2), 134. PMID 23412654.

- [281] S. Lesbirel, S. A. Wilson: The m6A-methylase complex and mRNA export. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, **2019**, 1862 (3), 319. PMID 30290229.
- [282] I. A. Roundtree, G.-Z. Luo, Z. Zhang, X. Wang, T. Zhou, *et al.*: YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, **2017**, 6. PMID 28984244.
- [283] J. Ofengand, A. Bakin, J. Wrzesinski, K. Nurse, B. G. Lane: The pseudouridine residues of ribosomal RNA. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, **1995**, 73 (11-12), 915. PMID 8722007.
- [284] M. Kos, D. Tollervey: Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Molecular cell*, **2010**, 37 (6), 809. PMID 20347423.
- [285] R. C. Brand, J. Klootwijk, T. J. van Steenberg, A. J. de Kok, R. J. Planta: Secondary methylation of yeast ribosomal precursor RNA. *European journal of biochemistry*, **1977**, 75 (1), 311. PMID 405217.
- [286] S. A. Udem, J. R. Warner: Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology*, **1972**, 65 (2), 227. PMID 4557192.
- [287] N. Okada, S. Nishimura: Enzymatic synthesis of Q nucleoside containing mannose in the anticodon of tRNA: isolation of a novel mannosyltransferase from a cell-free extract of rat liver. *Nucleic acids research*, **1977**, 4 (8), 2931. PMID 20603.
- [288] H. Grosjean, M. Sprinzl, S. Steinberg: Posttranscriptionally modified nucleosides in transfer RNA: Their locations and frequencies. *Biochimie*, **1995**, 77 (1-2), 139.
- [289] R. Oliva, L. Cavallo, A. Tramontano: Accurate energies of hydrogen bonded nucleic acid base pairs and triplets in tRNA tertiary interactions. *Nucleic acids research*, **2006**, 34 (3), 865. PMID 16461956.
- [290] D. E. Eyler, M. K. Franco, Z. Batool, M. Z. Wu, M. L. Dubuke, *et al.*: Pseudouridinylation of mRNA coding sequences alters translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2019**, 116 (46), 23068. PMID 31672910.
- [291] A. K. Hopper, D. A. Pai, D. R. Engelke: Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS letters*, **2010**, 584 (2), 310. PMID 19931532.
- [292] M. G. Goll, F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C.-L. Hsieh, *et al.*: Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science (New York, N.Y.)*, **2006**, 311 (5759), 395. PMID 16424344.
- [293] A. K. Hopper, A. H. Furukawa, H. D. Pham, N. C. Martin: Defects in modification of cytoplasmic and mitochondrial transfer RNAs are caused by single nuclear mutations. *Cell*, **1982**, 28 (3), 543. PMID 7074684.
- [294] S. R. Ellis, M. J. Morales, J. M. Li, A. K. Hopper, N. C. Martin: Isolation and characterization of the TRM1 locus, a gene essential for the N2,N2-dimethylguanosine modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, **1986**, 261 (21), 9703. PMID 2426253.
- [295] F. Vauti, T. Goller, R. Beine, L. Becker, T. Klopstock, *et al.*: The mouse Trm1-like gene is expressed in neural tissues and plays a role in motor coordination and exploratory behaviour. *Gene*, **2007**, 389 (2), 174. PMID 17198746.

## 7. Referenzen

- [296] N. Shindo-Okada, N. Okada, T. Ohgi, T. Goto, S. Nishimura: Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver. *Biochemistry*, **1980**, *19* (2), 395. PMID 6986171.
- [297] J. R. Katze, U. Gündüz, D. L. Smith, C. S. Cheng, J. A. McCloskey: Evidence that the nucleic acid base queuine is incorporated intact into tRNA by animal cells. *Biochemistry*, **1984**, *23* (6), 1171. PMID 6561966.
- [298] B. Sedgwick, P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs, T. Lindahl: Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA repair*, **2007**, *6* (4), 429. PMID 17112791.
- [299] S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick: Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, **2002**, *419* (6903), 174. PMID 12226667.
- [300] P. Ø. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg: AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, **2002**, *419* (6903), 178. PMID 12226668.
- [301] C. J. Schofield, Z. Zhang: Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Current opinion in structural biology*, **1999**, *9* (6), 722. PMID 10607676.
- [302] S. McClean, C. Costelloe, W. A. Denny, M. Searcey, L. P. Wakelin: Sequence selectivity, cross-linking efficiency and cytotoxicity of DNA-targeted 4-anilinoquinoline aniline mustards. *Anti-cancer drug design*, **1999**, *14* (3), 187. PMID 10500495.
- [303] Z. Chen, M. Qi, B. Shen, G. Luo, Y. Wu, *et al.*: Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs. *Nucleic acids research*, **2019**, *47* (5), 2533. PMID 30541109.
- [304] R. Liefke, I. M. Windhof-Jaidhauser, J. Gaedcke, G. Salinas-Riester, F. Wu, *et al.*: The oxidative demethylase ALKBH3 marks hyperactive gene promoters in human cancer cells. *Genome medicine*, **2015**, *7* (1), 66. PMID 26221185.
- [305] M. Tasaki, K. Shimada, H. Kimura, K. Tsujikawa, N. Konishi: ALKBH3, a human AlkB homologue, contributes to cell survival in human non-small-cell lung cancer. *British journal of cancer*, **2011**, *104* (4), 700. PMID 21285982.
- [306] M. Ueda, T. Shimizu, M. Mabuchi, K. Horiike, K. Kitae, *et al.*: Novel Metabolically Stable PCA-1/ALKBH3 Inhibitor Has Potent Antiproliferative Effects on DU145 Cells In Vivo. *Anticancer research*, **2018**, *38* (1), 211. PMID 29277775.
- [307] P. Wang, J. Wu, S. Ma, L. Zhang, J. Yao, *et al.*: Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate Inhibits ALKBH DNA Repair Enzymes and Sensitizes IDH Mutant Cells to Alkylating Agents. *Cell reports*, **2015**, *13* (11), 2353. PMID 26686626.
- [308] B. Chen, F. Ye, L. Yu, G. Jia, X. Huang, *et al.*: Development of cell-active N6-methyladenosine RNA demethylase FTO inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, **2012**, *134* (43), 17963. PMID 23045983.
- [309] Q. Li, Y. Huang, X. Liu, J. Gan, H. Chen, *et al.*: Rhein Inhibits AlkB Repair Enzymes and Sensitizes Cells to Methylated DNA Damage. *The Journal of biological chemistry*, **2016**, *291* (21), 11083. PMID 27015802.

- [310] L. You, X. Dong, X. Yin, C. Yang, X. Leng, *et al.*: Rhein Induces Cell Death in HepaRG Cells through Cell Cycle Arrest and Apoptotic Pathway. *International journal of molecular sciences*, **2018**, *19* (4). PMID 29614833.
- [311] D. T. Beranek: Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **1990**, *231* (1), 11.
- [312] B. Singer, T. P. Brent: Human lymphoblasts contain DNA glycosylase activity excising N-3 and N-7 methyl and ethyl purines but not O6-alkylguanines or 1-alkyladenines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1981**, *78* (2), 856. PMID 6940152.
- [313] R. H. Elder, J. G. Jansen, R. J. Weeks, M. A. Willington, B. Deans, *et al.*: Alkylpurine-DNA-N-glycosylase knockout mice show increased susceptibility to induction of mutations by methyl methanesulfonate. *Molecular and cellular biology*, **1998**, *18* (10), 5828. PMID 9742100.
- [314] A. Pendlebury, I. M. Frayling, M. F. Santibanez Koref, G. P. Margison, J. A. Rafferty: Evidence for the simultaneous expression of alternatively spliced alkylpurine N-glycosylase transcripts in human tissues and cells. *Carcinogenesis*, **1994**, *15* (12), 2957. PMID 8001263.
- [315] K. Bonanno, J. Wyrzykowski, W. Chong, Z. Matijasevic, M. R. Volkert: Alkylation resistance of E. coli cells expressing different isoforms of human alkyladenine DNA glycosylase (hAAG). *DNA repair*, **2002**, *1* (7), 507. PMID 12509225.
- [316] H. E. Krokan, H. Nilsen, F. Skorpen, M. Otterlei, G. Slupphaug: Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS letters*, **2000**, *476* (1-2), 73. PMID 10878254.
- [317] R. Hauenschild, L. Tserovski, K. Schmid, K. Thüring, M.-L. Winz, *et al.*: The reverse transcription signature of N-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent. *Nucleic acids research*, **2015**, *43* (20), 9950. PMID 26365242.

